

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etablissement des profils d'abondance des protéines impliquées dans la réponse à long terme de kératinocytes humains exposés aux UVB

Boilan, Emmanuelle

Award date:
2006

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**ETABLISSEMENT DES PROFILS D'ABONDANCE DES PROTEINES
IMPLIQUEES DANS LA REPONSE A LONG TERME DE KERATINOCYTES
HUMAINS EXPOSES AUX UVB**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Emmanuelle BOILAN

Juin 2006

REMERCIEMENTS

Au terme de ces quelques mois passés dans le département Biologie Cellulaire, j'ai le plaisir d'adresser mes plus sincères remerciements à Monsieur le Professeur José REMACLE pour m'avoir accueillie et permis de réaliser mon mémoire dans son département ainsi que le Professeur Olivier TOUSSAINT et le Professeur Yves POUMAY qui m'ont guidée, conseillée et encouragée tout au long de mon travail.

Ma reconnaissance va également à Véronique VALLERY pour son optimisme dans toutes les circonstances, ses précieux conseils, sa disponibilité, sa bonne humeur, sa patience, les corrections de mes premières ébauches. Un grand merci à toi d'avoir fait de ce mémoire un travail agréable et enrichissant.

J'exprime également ma profonde gratitude à :

Tous les membres de mon jury pour avoir pris le temps de lire ce manuscrit.

Tous les mémorants et toutes les personnes qui m'ont aidée au cours de ce mémoire, et plus particulièrement à Edouard et à Marc, pour tous leurs conseils et leur bonne humeur.

Je ne voudrais pas oublier François, sa famille, mes parents, mon « ti frère », mes mamys et le reste de la famille pour leur précieux réconfort dans les moments difficiles, leur soutien, leur aide très précieuse, pour m'avoir encouragée et m'avoir fait confiance au cours de toutes ces années ainsi que Monsieur RENQUET et Madame SEVRIN pour m'avoir communiqué leur amour pour la biologie. Un grand MERCI à tous pour avoir permis la réalisation de mon rêve, nous sommes arrivés ensemble au bout de quelque chose qui me tient vraiment à cœur.

Etablissement des profils d'abondance de protéines impliquées dans la réponse à long terme de kératinocytes humains exposés aux UVB.

Boilan Emmanuelle

Résumé

L'épiderme constitue notre première barrière de défense contre les ultraviolets-B (UV-B). Au cours de ce mémoire, nous avons étudié la réponse à long terme de kératinocytes humains exposés à des doses sublétales et répétées d'UVB. Cette série d'expositions entraîne, entre autres, l'arrêt de leur prolifération et un changement morphologique.

Premièrement, nous avons étudié les variations d'abondance de protéines potentiellement impliquées dans le phénotype observé, et cela tout au cours de la récupération des cellules. Les kératines 6, 8 (K6 et K8) et deux de leurs formes phosphorylées, sont des composants des filaments intermédiaires. CapG, est une protéine de coiffe de l'actine. La protéine chaperone HSP27 joue des rôles de protection contre les stress oxydatifs et contrôle la dynamique de l'actine. Nous avons réalisé des extraits protéiques entre les stress et après 30, 90 minutes et 3, 6, 16, 40 et 64 heures de récupération. De plus, nous avons déterminé la localisation subcellulaire de ces protéines par immunofluorescence.

Nous avons montré que capG, les K 6, 8 et les formes phosphorylées de K8 voient leur abondance augmenter dans les cellules exposées aux UVB dès 6 heures de récupération après le dernier stress. Ces inductions se maintiennent à 16, 40 et 64h après les stress, ce que nous avons confirmé par marquage en immunofluorescence. De plus, nous avons observé que dans les cellules exposées aux UVB, capG et l'actine colocalisent et forment un anneau à la périphérie de la cellule. HSP27 est, quant à elle, phosphorylée dans les cellules exposées aux UVB, à différents moments entre les stress, puis de 30 minutes à 64 heures après le dernier stress.

Deuxièmement, nous avons analysé les voies de signalisation potentiellement impliquées dans l'induction de ces protéines. Nous avons donc étudié la phosphorylation du récepteur à l'EGF, de ERK et de p38^{MAPK} suivant les mêmes cinétiques. Nous n'avons pas observé de phosphorylation du récepteur de l'EGF, ni de ERK dans les cellules exposées aux UVB. Par contre, nous avons mis en évidence que p38^{MAPK} est phosphorylée chez les cellules exposées aux UVB dans les temps dits « courts ».

L'ensemble des inductions de ces protéines pourrait donc avoir un rôle dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et du réseau de kératines des cellules exposées aux UVB puisque celles-ci évoluent vers une morphologie étalée.

Liste des abréviations

2D	2 dimensions
2D-DIGE	2D-differential gel electrophoresis
ADN	acide désoryribonucléique
AP-1	activated protein-1
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adenosine tri-phosphate
C	cytosine
CapG	capping protein actin filament gelsolin like
CDK	cycline dependent kinase
DAG	diacylglycérol
EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular signal regulated kinase
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase
GDP	guanosine di-phosphate
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GTP	guanosine tri-phosphate
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogene
HER	human EGF receptor
HK8	keratine 8 hyperphosphorylée
hsp	heat shock protein
IFN γ	interferon gamma
IL-1	interleukine-1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
K	keratine
K8PS73	phosphorylation de la Serine 73 de la kératine 8
K8PS431	phosphorylation de la Serine 431 de la kératine 8
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKK	mitogen-activated protein kinase kinase
MEK	= MAPKK
mJ/cm ²	millijoule/cm ²
MMP	metalloproteinase
N-htert	kératinocytes humains normaux immortalisés par la télomérase
nm	nanomètre
PCR	polymerisation chain reaction
P13K	phosphatidylinositol-3 kinase
PKC	proteine kinase C
PLC	phospholipase C
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SAPK	stress activated protein kinase
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SH2	Src homology 2
SH3	Src homology 3
Shc	Src homology C
sHsp	small heat shock protein

SIPS	sénescence induite prématurément par les stress
T	thymine
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxyde
TGF- β	transforming growth factor- β
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha
UV	ultraviolets
UV-A	ultraviolets de type A
UV-B	ultraviolets de type B
UV-C	ultraviolets de type C

Table des matières

INTRODUCTION

CONTEXTE GENERAL.....	1
1 LA PEAU	3
1.1 L'EPIDERME	3
1.1.1 Les types cellulaires mineurs constituant l'épiderme.....	3
1.1.2 Le type cellulaire majeur de l'épiderme : les kératinocytes.....	4
1.2 INTERFACE ENTRE L'EPIDERME ET LE DERMIS : LA LAME BASALE	4
1.3 LE DERMIS.....	4
1.4 L'HYPODERME	5
2 PROCESSUS DE DIFFERENCIATION DU KERATINOCYTE.....	6
2.1 PROCESSUS DE DIFFERENCIATION ET STRATIFICATION	6
2.1.1 La couche basale.....	6
2.1.2 La couche épineuse	6
2.1.3 La couche granuleuse	6
2.1.4 La couche cornée	7
2.2 MARQUEURS DE DIFFERENCIATION	7
2.2.1 Les kératines	7
2.2.2 L'involucrine et la loricrine	8
3 LES ULTRAVIOLETS ET LEURS EFFETS	9
3.1 LES ULTRAVIOLETS (UV)	9
3.2 PENETRATION DES UV A TRAVERS LA PEAU	9
3.3 LES ULTRAVIOLETS ET LEURS EFFETS	10
3.3.1 Les effets généraux.....	10
3.3.2 Les effets sur l'ADN.....	10
3.4 ACTIVATION DE VOIES INTRACELLULAIRES PAR LES UV : VOIE DU RECEPTEUR EGF	12
3.4.1 Le récepteur de l'epidermal growth factor (EGF)	12
3.4.2 Les MAPK.....	13
3.5 DEFENSE CONTRE LES UV : LES PROTEINES DE CHOC THERMIQUE (HEAT SHOCK PROTEIN OU HSP)	14
3.5.1 Heat shock protein 27 (Hsp27).....	14
4 LE MODELE DE STRESS REPETES ET SUB-LETAUX D'UV-B.....	16
4.1 MODELE DES STRESS, ETUDE DES BIOMARQUEURS ET ETUDE PROTEOMIQUE.....	16
4.1.1 Modèle des stress	16
JOUR 1.....	16
JOUR 2.....	16
JOUR 3.....	16
JOUR 4.....	16
JOUR 5.....	16
4 STRESS DE 300 MJ/CM².....	16
4 STRESS DE 300 MJ/CM².....	16
RECUPERATION	16
RECUPERATION	16
ETUDE DE LA REPONSE A LONG TERME.....	16
4.1.2 Etude protéomique.....	17
4.1.3 Etablissement des hypothèses de travail de ce mémoire.....	17
4.2 LES PROTEINES ETUDIEES	17
LA PHOSPHORYLATION DE HSP27 EN REPONSE AUX UV-B A DEJA ETE MISE EN EVIDENCE (WONG, SHI ET AL. 2000) ET A ETE DEVELOPPEE AU POINT 3.4. NOUS ALLONS APPROFONDIR LA DESCRIPTION DES DEUX AUTRES PROTEINES ETUDIEES AU COURS DE CE MEMOIRE, POUR RAPPEL : LES KERATINES 8 ET 6, ET CAPG.	17
4.2.1 Les protéines du cytosquelette : Kératine 6 & 8.....	17
4.2.2 Les protéines modulant le cytosquelette : CapG.....	18
4.3 LES PROTEINES ETUDIEES	19

5	HYPOTHESES DE TRAVAIL	20
5.1	LITTERATURE	20
5.2	HYPOTHESES DE TRAVAIL	21
6	OBJECTIFS DU MEMOIRE.....	22

MATERIEL & METHODES

1	CONDITIONS DE CULTURE DES KERATINOCYTES N-HTERT	23
1.1	PRINCIPE	23
1.2	MATERIEL ET SOLUTIONS.....	23
1.3	METHODE D'ENSEMENCEMENT.....	23
1.4	METHODE DE DECONGELATION	23
1.5	CONGELATION DES CELLULES.....	24
2	STIMULATION A L'EGF	24
2.1	MATERIELS ET SOLUTIONS.....	24
2.2	MÉTHODE	24
3	STRESS REPETES SUB-LETAUX AUX UVB.....	24
3.1	PRINCIPE	24
3.2	MATERIEL ET SOLUTIONS.....	24
3.3	METHODE	24
4	LES EXTRACTIONS PROTEIQUES	25
4.1	PRINCIPE	25
4.2	MATERIEL ET SOLUTIONS	25
4.3	METHODE 1 : EXTRACTION AVEC LE TAMPON " BIOSOURCE"	25
4.4	METHODE 2 : EXTRACTION AVEC LA TRYPSINE	25
4.5	METHODE 3 : EXTRACTION AVEC LE TAMPON "DLA"	26
5	LE DOSAGE PROTEIQUE PAR LA METHODE DU BRADFORD.....	26
5.1	PRINCIPE	26
5.2	MATERIEL ET SOLUTIONS	26
5.3	METHODE	26
6	LE WESTERN BLOT	26
6.1	PRINCIPE	26
6.2	MATERIEL ET SOLUTION	27
6.3	METHODE	27
6.3.1	<i>L'électrophorèse.....</i>	<i>27</i>
6.3.2	<i>Transfert des protéines sur membrane (semi-dry blotting).....</i>	<i>28</i>
6.3.3	<i>Traitement de la membrane et détection de chémoluminescence.....</i>	<i>28</i>
7	L'EXTRACTION D'ARN.....	29
7.1	PRINCIPE	29
7.2	MATERIEL ET SOLUTIONS.....	29
7.3	METHODE	29
7.3.1	<i>L'extraction de l'ARN total.....</i>	<i>29</i>
7.3.2	<i>Précipitation de l'ARN total.....</i>	<i>30</i>
7.3.3	<i>Lavage et resuspension de l'ARN total.....</i>	<i>30</i>
8	LA TRANSCRIPTION INVERSE.....	30
8.1	PRINCIPE	30
8.2	MATERIEL ET SOLUTIONS.....	30
8.3	METHODE	30

9	LA PCR EN TEMPS RÉEL	31
9.1	PRINCIPE	31
9.2	MATERIEL ET SOLUTIONS.....	31
9.3	METHODE	31
10	DETECTION DE PROTEINES SPECIFIQUES PAR IMMUNOFLUORESCENCES	32
10.1	PRINCIPE	32
10.2	MATERIEL ET SOLUTIONS.....	32

RESULTATS & DISCUSSION

1	INTRODUCTION	36
1.1	LES MISES AU POINT.....	36
1.1.1	<i>Etude des marqueurs induits par les stress aux UV-B : influence de la confluence des cellules ..</i>	<i>36</i>
	<i>(Figures 3 a et b).....</i>	<i>36</i>
1.1.2	<i>Contrôle positif du récepteur EGF actif.....</i>	<i>37</i>
1.1.3	<i>Choix du tampon de lyse</i>	<i>38</i>
2	PROFIL D'ABONDANCE DES PROTEINES D'INTERET LORS DE LA REPOSE DES KERATINOCYTES APRES EXPOSITIONS REPETEES A DES DOSES SUB-LETALES AUX UV-B PENDANT LA RECUPERATION.....	39
2.1	MOTIVATIONS ET DEMARCHE SCIENTIFIQUE	39
2.2	CAPG	39
2.2.1	<i>Profil d'abondance et localisation cellulaire de CapG au cours de la récupération après exposition aux UV-B.....</i>	<i>39</i>
2.2.2	<i>Discussion</i>	<i>40</i>
2.3	LA KERATINE 8	41
2.3.1	<i>Profil d'abondance et phosphorylation de la kératine 8 au cours de la récupération après exposition aux UV-B.....</i>	<i>41</i>
2.3.2	<i>Profil d'abondance et localisation cellulaire de la kératine 8 et de ses deux types de phosphorylation au cours de la récupération après exposition aux UV-B.....</i>	<i>42</i>
2.3.3	<i>Discussion</i>	<i>42</i>
2.4	LA KERATINE 6	43
2.4.1	<i>Profil d'abondance de la kératine 6 au cours de la récupération après exposition aux UV-B.....</i>	<i>43</i>
2.4.2	<i>Discussion</i>	<i>43</i>
2.5	HSP27	43
2.5.1	<i>Profil d'abondance et phosphorylation de la protéine Hsp27 au cours de la récupération après exposition aux UV-B.....</i>	<i>43</i>
2.5.2	<i>Discussion</i>	<i>44</i>
2.6	p38 ^{MAPK} ET LES AUTRES MAPK.....	44
2.6.1	<i>Profil de phosphorylation de p38^{MAPK} au cours de la récupération après exposition aux UV-B..</i>	<i>44</i>
2.6.2	<i>Profil de phosphorylation de ERK au cours de la récupération après exposition aux UV-B.....</i>	<i>45</i>
2.7	LE RECEPTEUR A L'EGF.....	46
2.7.1	<i>Profil de phosphorylation du récepteur à l'EGF au cours de la récupération après exposition aux UV-B</i>	<i>46</i>
2.7.2	<i>Discussion</i>	<i>46</i>
3	ETUDE DES PROTEINES IMPLIQUEES ENTRE LES STRESS SUB-LETAUX AUX UV-B ET PENDANT LA RECUPERATION.....	47
3.1	MOTIVATIONS ET DEMARCHE SCIENTIFIQUE	47
3.2	LE RECEPTEUR DE L'EGF	47
3.2.1	<i>Profil d'abondance et phosphorylation du récepteur de l'EGF entre les stress et au cours de la récupération après exposition UV-B</i>	<i>47</i>
3.3	CAPG	48
3.3.1	<i>Profil d'abondance de CapG entre les stress et au cours de la récupération après exposition aux UV-B</i>	<i>48</i>

3.4	LA KERATINE 8	48
3.4.1	<i>Profil d'abondance et phosphorylation de la kératine 8 entre les stress et au cours de la récupération après exposition aux UV-B.....</i>	48
3.5	LA KERATINE 6	49
3.5.1	<i>Profil d'abondance de la kératine 6 entre les stress et au cours de la récupération après exposition aux UV-B.....</i>	49
3.6	HSP27	49
3.6.1	<i>Profil d'abondance et phosphorylation de la protéine Hsp27 entre les stress et au cours de la récupération après exposition aux UV-B.....</i>	49
3.7	P38 ^{MAPK} ET LES AUTRES MAPK	49
3.7.1	<i>Profil d'abondance et phosphorylation de p38^{MAPK} entre les stress et au cours de la récupération après exposition aux UV-B.....</i>	49
3.7.2	<i>Profil d'abondance et phosphorylation de ERK entre les stress et au cours de la récupération après exposition UV-B.....</i>	50
3.8	DISCUSSION	50

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

1	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	53
1.1	LE RECEPTEUR DE L'EGF	53
1.2	p38 ^{MAPK}	53
1.2.1	<i>Lien potentiel entre p38^{MAPK} et Hsp27</i>	53
1.3	CAPG, LA KERATINE 8, SES DEUX TYPES DE PHOSPHORYLATION ET LA KERATINE 6	54
1.3.1	<i>CapG</i>	54
1.3.2	<i>Les kératines 6 , 8 et ses phosphorylations.....</i>	55
	BIBLIOGRAPHIE.....	57

INTRODUCTION

Contexte général

Bien vieillir est l'une des préoccupations principales du monde occidental d'aujourd'hui. Le vieillissement est un mécanisme encore mal élucidé qui fait l'objet de nombreuses recherches. C'est un processus complexe, constitué, d'une part, du vieillissement intrinsèque, qui est déterminé génétiquement et d'autre part, du vieillissement extrinsèque, qui est induit par des facteurs environnementaux tels que les rayons ultraviolets. Ces facteurs peuvent être défavorables pour un organisme vivant et constituent une source d'agression, menant à une réponse de cet organisme (Jenkins 2002).

De plus en plus de travaux suggèrent qu'il existe un lien entre le processus de vieillissement des cellules et l'augmentation de la production des espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène. On a d'ailleurs observé un déclin des défenses antioxydantes, une accumulation des dommages à l'ADN et une augmentation de la concentration en protéines oxydées au cours du vieillissement normal (Sohal 2002).

Il a été proposé que l'exposition des cellules à des stress oxydants d'intensité sub-létale pourrait être en partie responsable du vieillissement cellulaire *in vivo*. Par exemple, des fibroblastes exposés à des stress oxydatifs sub-létaux divers comme les ultraviolets semblent vieillir prématurément ou encore "entrer en sénescence prématurée". Le concept de la sénescence induite prématurément par un stress ou SIPS était né. La SIPS peut être considérée comme une réponse à long terme aux stress et se caractérise entre autres par un arrêt du cycle cellulaire. Les stress conduisant à l'apparition de la SIPS peuvent être de diverses natures comme par exemple : le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, les ultraviolets, le *tert*-Butylhydroperoxide (t-BHP) etc (Toussaint, Remacle et al. 2002).

Chaque jour, les cellules de la peau, qui constituent notre première ligne de défense face aux agressions extérieures, sont confrontées à des stress. La peau est composée de trois couches : épiderme, derme et hypoderme. L'épiderme est la couche la plus externe, l'hypoderme la plus interne et le derme est entre les deux. Vu leur disposition, ces couches ne sont pas confrontées de la même manière aux stress, comme les UV. Ceux-ci sont considérés comme étant le stress environnemental le plus important auquel est exposé la peau. Un modèle de SIPS induite par des expositions répétées de fibroblastes humains de derme à des doses sub-létales d'ultraviolets B (UV-B) a été mis au point dans notre laboratoire (Chainiaux, Magalhaes et al. 2002). Il était donc logique de s'intéresser ensuite à l'épiderme qui représente la couche la plus exposée aux ultraviolets.

Ce mémoire consiste à étudier des protéines impliquées dans la réponse à long terme des kératinocytes immortalisés exposés à des doses répétées sub-létales d'ultraviolets B (UV-B). Un modèle a donc été mis au point par Véronique Vallery. Différentes caractéristiques de la sénescence comme un arrêt de la prolifération, une morphologie étalée, une augmentation de l'expression de p21^{WAF-1}, cette protéine étant impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, ont été mises en évidence. Mais l'apparition d'un marqueur de la différenciation tardive des kératinocytes, l'involucrine, soulève des interrogations. Il se pourrait que l'exposition répétée aux UV-B induise une réponse cellulaire plus proche de la différenciation des kératinocytes plutôt que la sénescence ou que la surexpression de l'involucrine fasse partie d'un programme de défense cellulaire face à certains types de stimuli.

L'introduction de ce mémoire s'organise en six parties. Il nous a semblé important de commencer par une description de la peau et de son organisation. Le processus de différenciation des kératinocytes, type cellulaire majoritaire de l'épiderme, sera explicité dans la deuxième partie de cette introduction. La troisième partie a pour but de nous donner un bref

aperçu des différents effets causés par les ultraviolets de type A, B et C et ce, à différents niveaux. Le modèle *in vitro* d'expositions répétées de kératinocytes humains aux UV-B sera ensuite décrit dans la quatrième partie et débouchera sur la description des protéines impliquées dans la réponse à long terme des kératinocytes exposés aux UVB étudiées lors de ce mémoire. La cinquième partie traitera des liens éventuels entre ces protéines impliquées dans la réponse à long terme et explicitera le modèle hypothétique établi. Enfin, les objectifs de ce mémoire ainsi que l'approche expérimentale choisie seront présentés dans la dernière partie.

1 La peau

La peau est constituée de trois couches distinctes, l'épiderme, le derme et l'hypoderme (figure 1) et possède plusieurs rôles qui sont essentiels pour le maintien de l'organisme : protection, sensibilité, thermorégulation et métabolisme.

Comme expliqué précédemment, la peau représente la première barrière de défense que possède notre organisme face aux agressions extérieures comme les ultraviolets (UV), la pollution, etc. Une protection souple et efficace contre les agressions mécaniques est assurée par la couche cornée de l'épiderme, constituant une solide barrière continue. Les fibres de collagènes et les fibres élastiques du derme donnent à la peau leur force de tension et d'élasticité. Le tissu adipeux de l'hypoderme protège les muscles et les os sous-jacents contre les chocs et les pressions. Il existe deux formes de protection contre les agressions chimiques : la couche cornée et le film formé par la sueur et le sébum. Ceux-ci forment des barrières qui ne sont pas infranchissables. En effet, certains produits peuvent pénétrer à travers la peau et gagner la circulation générale ; ce mode de pénétration est de plus en plus utilisé pour l'application de certains médicaments. La couche cornée, les cellules immunitaires et la flore microbienne normale, développée à la surface de la peau, constituent une protection contre les micro-organismes.

La peau est également l'organe sensoriel le plus important car elle informe l'organisme sur quatre grands groupes de sensations : le toucher, la douleur, la température et la pression grâce à la présence de terminaisons nerveuses libres et encapsulées.

La thermorégulation constitue une autre fonction importante assurée par la peau. En effet, celle-ci minimise les pertes de chaleur grâce à la présence de tissu adipeux situé dans l'hypoderme et grâce aux poils tandis que l'évacuation de l'excès de chaleur est assurée par la dilatation active des vaisseaux sanguins et la fermeture des anastomoses du derme et par la sudation.

Finalement, la peau collabore à la synthèse de vitamine D au niveau de l'épiderme (Lehmann, Querings et al. 2004) et permet l'accumulation de triglycérides dans les cellules adipeuses de l'hypoderme, ceci constituant un stockage énergétique.

1.1 L'épiderme

L'épiderme humain, tissu épithélial stratifié kératinisé, est composé de quatre types cellulaires différents : les mélanocytes, les cellules de Langerhans, les cellules de Merckel et les kératinocytes.

1.1.1 Les types cellulaires mineurs constituant l'épiderme

Les mélanocytes

Les mélanocytes, situées dans la couche basale, sont des cellules dendritiques dont les prolongements cytoplasmiques s'insinuent entre les kératinocytes. Ces cellules synthétisent de nombreuses cytokines et produisent également la mélanine, un pigment en partie responsable de la couleur de la peau et des phanères. La mélanine est produite au niveau d'organites ovoïdes nommés mélanosomes et situés dans le cytoplasme. Ces organites subissent un processus de différenciation en quatre stades, la mélanogénèse, qui aboutit à une accumulation de mélanine et à son transfert vers les kératinocytes.

Il a été démontré que l'exposition aux ultraviolets entraînait une stimulation de la mélanogénèse et *in vitro* une augmentation du nombre de mélanocytes (Abdel-Naser, Krasagakis et al. 2003).

Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans, de forme dendritique, dérivent de cellules hématopoïétiques situées dans la moelle osseuse. Ces cellules jouent un rôle important dans la réponse immunitaire. Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes, qui après avoir ingéré des particules étrangères, comme les micro-organismes, les phagocytent et les présentent à la surface de leur membrane en présence de signaux co-stimulateurs dans le but d'activer les lymphocytes T. Les rôles de ces cellules sont d'initier et de propager les réponses immunes dirigées contre ces antigènes.

Les cellules de Merckel

Les cellules de Merckel, situées de façon dispersée dans la couche basale, sont des cellules neuro-endocrines qui expriment des marqueurs neuronaux tels que des neuropeptides et des marqueurs épithéliaux tels que des kératines. Ces cellules sont attachées aux kératinocytes par des desmosomes et agissent comme des mécanorécepteurs.

1.1.2 Le type cellulaire majeur de l'épiderme : les kératinocytes

Les kératinocytes constituent 95% de l'épiderme et assurent trois grandes fonctions au sein de celui-ci.

D'abord, leur cytosquelette et le système de jonctions d'adhésion entre les cellules (desmosomes) et avec la matrice extracellulaire (hémidesmosomes) permettent le maintien de la cohésion de l'épiderme. L'existence d'une connexion entre le réseau de filaments de kératine et les jonctions d'adhésion permet de répartir et de transmettre les forces qui sont appliquées au tissu.

Ensuite, la couche cornée, constituée de kératinocytes en différenciation terminale, représente une barrière efficace entre les milieux intérieur et extérieur de l'organisme.

Enfin, le transfert des mélanosomes de type IV, provenant des mélanocytes, aux kératinocytes joue un rôle important dans la protection de la peau contre les rayons ultraviolets.

1.2 Interface entre l'épiderme et le derme : la lame basale

Tous les tissus épithéliaux reposent sur une lame basale qui les sépare du tissu conjonctif sous-jacent. La lame basale située entre l'épiderme et le derme est une région d'ancrage pour les kératinocytes via les hémidesmosomes et permet donc de relier ces deux couches. L'organisation de la lame basale empêche la séparation de l'épiderme et du derme par des forces de cisaillement.

Elle représente par exemple une barrière physiologique et en particulier dans le domaine de la pathologie tumorale. Elle intervient comme filtre pour leur nutrition.

1.3 Le derme

Le derme est le tissu conjonctif sur lequel repose l'épiderme. Les fibroblastes constituent le type cellulaire principal, ceux-ci baignent dans une matrice extracellulaire composée de fibres de collagène, de fibres élastiques et de substance amorphe. Le derme renferme également de nombreuses terminaisons nerveuses, des nerfs, des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Des poils, des ongles, des glandes sébacées et sudoripares, nommés dérivés

épidermiques, sont également présents dans le derme. Ce tissu est divisé en deux parties : le derme papillaire superficiel et le derme réticulaire profond.

1.4 L'hypoderme

L'hypoderme, également un tissu conjonctif, contient de nombreux vaisseaux et de lobules adipeux séparés par des travées de type conjonctif. La répartition de ces lobules dépend des conditions de nutrition et des régions de la peau. L'hypoderme possède plusieurs fonctions, il constitue un stock d'énergie à travers les adipocytes qui le composent en partie et joue un rôle de protection mécanique et thermique.

2 Processus de différenciation du kératinocyte

L'existence d'un équilibre entre la prolifération et la différenciation des kératinocytes, régulé par de multiples signaux tels que les cytokines et les facteurs de croissance, démontre à quel point l'épiderme est un tissu dynamique. Par exemple, le facteur épidermique EGF (Epidermal Growth Factor) stimule la prolifération cellulaire des kératinocytes tandis que le TGF β (Transforming Growth Factor β) favorise leur différenciation. Notons que l'atteinte de la confluence en culture implique également la différenciation.

Les kératinocytes prolifèrent à partir de la couche basale ou germinative, située à l'interface épidermo-dermique, et migrent vers l'extérieur tout en subissant un processus de différenciation complexe qui aboutit à la mort cellulaire. Ce processus de différenciation mène à une organisation en quatre couches visibles en coupe histologique. Ces couches sont nommées : couche basale, couche épineuse, couche granuleuse et couche cornée.

2.1 Processus de différenciation et stratification

(Figure 2)

2.1.1 La couche basale

La couche basale ou germinative, ancrée dans la lame basale par des hémidesmosomes, juste au-dessus du derme, est composée notamment de cellules souches qui possèdent un potentiel de division lent mais illimité. Ces cellules engendrent d'autres cellules appelées cellules intermédiaires amplificatrices qui se divisent beaucoup plus rapidement mais de façon limitée. Celles-ci donnent elles-mêmes naissance à d'autres cellules capables de quitter la couche basale et de suivre le processus de différenciation débouchant sur une organisation en quatre couches (Bickenbach and Grinnell 2004) (Watt 1998). Le processus de différenciation débute lorsque les hémidesmosomes sont rompus, ce qui mène à la perte d'adhésion de la cellule à la matrice extracellulaire.

2.1.2 La couche épineuse

La couche épineuse est caractérisée d'une part par la présence de nombreux desmosomes menant à une morphologie cellulaire en épine, et d'autre part par l'apparition de corps d'Odland ou corps lamellaires. Elle est composée de cellules qui s'aplatissent au fur et à mesure qu'elles se différencient et donc de leur ascension dans l'épiderme. Le noyau et les organites ne semblent pas modifiés mais une réorganisation des kératines en faisceaux denses est décelable. Les corps d'Odland se remplissent de lipides, d'enzymes capables de les modifier, d'hydrolases acides et d'hydrates de carbone ; ces derniers joueront un rôle dans la différenciation.

2.1.3 La couche granuleuse

La couche granuleuse est composée de cellules très aplaties dont les noyaux commencent à dégénérer mais la caractéristique principale de cette couche est l'apparition au sein des faisceaux de kératine de grains de kératohyaline constitués de profilagrine. C'est entre la couche granuleuse et la couche cornée que les corps d'Odland vont libérer leur contenu par exocytose dans le milieu intercellulaire de la couche cornée, constituant ainsi le ciment intercellulaire.

2.1.4 La couche cornée

La couche cornée est constituée de kératinocytes prenant le nom de cornéocytes. Ceux-ci sont complètement aplatis, les noyaux et organites cytoplasmiques ont totalement disparu et le cytoplasme est rempli de faisceaux de kératine.

Les membranes plasmiques ont un aspect plus dense et les desmosomes sont modifiés et prennent le nom de cornéodesmosomes.

Il y a également une modification de l'organisation des filaments intermédiaires qui passe d'une organisation en faisceau à une organisation en réseau dense.

A la surface de la couche cornée, les cornéocytes se détachent de l'épiderme suite à la lyse du ciment intercellulaire principalement sous l'action de l'enzyme stéroïde-sulfatase, sécrétée par les corps d'Odland, ce processus est nommé desquamation (Nemes and Steinert 1999).

2.2 Marqueurs de différenciation

Le processus de différenciation que subissent les kératinocytes humains peut être caractérisé par des marqueurs. En effet, dès que le kératinocyte commence à se différencier, il subit des modifications moléculaires. Ces modifications permettent de distinguer les cellules non différenciées des cellules différenciées et même de pouvoir déterminer si le kératinocyte est en différenciation précoce ou tardive.

Des changements interviennent au niveau de la composition des filaments intermédiaires de kératine et de nouvelles protéines impliquées dans la formation de la cornée telles que l'involucrine et la loricrine ; ces dernières caractérisent les kératinocytes en différenciation tardive.

2.2.1 Les kératines

Les kératines sont des protéines du cytosquelette. Le cytosquelette possède un rôle important dans différents processus comme le maintien de la structure cellulaire, la mobilité, la division et la différenciation cellulaire. Il est composé de trois éléments :

- Les microfilaments d'actine (diamètre 7 nm)
- Les microtubules composés de dimères de tubuline (diamètre 25 nm)
- Les filaments intermédiaires (diamètre 10 nm)

Les kératines appartiennent à la famille des protéines de filaments intermédiaires. Ces filaments intermédiaires possèdent tous la même organisation structurale : un domaine central d'hélices α composé d'environ 310 acides aminés, encadré par un domaine amino-terminal et un domaine carboxy-terminal de taille variable. Par la formation d'un réseau protéique filamenteux, elles confèrent à la peau sa résistance aux frictions mécaniques et son imperméabilité. Les filaments de kératines élaborent des réseaux constitués de tonofilaments correspondant à la juxtaposition de plusieurs filaments de 10 nm de diamètre. D'autres protéines sont impliquées dans la modulation de ce cytosquelette telles que des protéines de fragmentation, des protéines d'ancrage, des protéines de coiffe, etc...

Les kératines sont divisées en deux types : les kératines acides (K1 à K8) et les kératines basiques (K9 à K20). La polymérisation des filaments de kératines est initiée obligatoirement par un hétérodimère comprenant une protéine de chaque type (Coulombe 1993). La cellule épithéliale coordonne l'expression de deux kératines pour produire un réseau de kératine, la paire de kératines étant spécifique d'un état de différenciation. Il semblerait que chaque paire de kératines confère des propriétés mécaniques spécifiques adaptées aux cellules dans lesquelles elles sont exprimées (Coulombe and Omary 2002). On dénombre plus de cinquante gènes qui codent pour les kératines (Fuchs 1994). Elles sont

synthétisées et utilisées par de nombreux êtres vivants comme éléments de structure, indispensables à la cohésion et à l'intégrité des tissus épithéliaux. Mais leurs rôles cellulaires ne s'arrêtent pas là. En effet, les kératines semblent participer à la différenciation des épithéliums. Certaines kératines représentent les marqueurs de différenciation de l'épiderme.

L'abondance de ces protéines varie en fonction de la localisation dans l'épiderme et donc du stade de différenciation du kératinocyte.

Les kératines 5 (K5) et 14 (K14) sont exprimées de façon majoritaire dans la couche basale de l'épiderme et caractérisent des cellules non différenciées. Les kératines 1 et 10 se localisent dans les couches suprabasales composées de cellules différenciées, ce qui constitue un marqueur de différenciation précoce (Poumay and Pittelkow 1995).

2.2.2 L'involucrine et la loricrine

Ces deux protéines interviennent dans la formation de la cornée et sont donc considérées comme des marqueurs de différenciation tardive ; elles sont exprimées majoritairement dans la couche granuleuse.

3 Les ultraviolets et leurs effets

Le stress environnemental le plus important auquel est confrontée la peau est l'exposition aux ultraviolets (UV). Deux des effets de cette exposition, l'accélération du processus du vieillissement de la peau et l'augmentation du risque de cancer, sont causés par l'altération de multiples mécanismes et ce, à différents niveaux.

3.1 Les ultraviolets (UV)

La lumière solaire est composée de rayonnements électromagnétiques de longueurs d'onde différentes qui peuvent être classés en trois grandes catégories. Les rayonnements ultraviolets, qui ont une longueur d'onde variant de 190 à 400 nm, la lumière visible, dont la longueur d'onde se situe entre 400 et 800 nm, et les infrarouges, dont la longueur d'onde est supérieure à 800 nm.

Le rayonnement ultraviolet (UV) peut être également divisé en trois catégories en fonction de ses longueurs d'onde. Les UV-A, UV-B et UV-C possèdent des longueurs d'onde situées respectivement entre 320 et 400 nm, entre 290 nm et 320 nm et entre 190 et 290 nm (Tyrrell 1995).

L'atmosphère constitue une barrière naturelle contre les UV. En effet, les UV-C sont en principe complètement arrêtés par la couche d'ozone. Par contre, les UV-A ainsi qu'une petite partie des UV-B atteignent la surface de la Terre. L'intensité des ultraviolets arrivant à la surface de la Terre dépend d'une multitude de facteurs tels que la concentration dans l'atmosphère de pollutions diverses, des nuages etc. L'appauvrissement de la couche d'ozone stratosphérique entraîne une augmentation de la proportion des UV-B qui atteignent la surface de la terre, constituant peut-être l'un des facteurs qui ont influencé l'accroissement des cancers de la peau ces dernières années (Saladi and Persaud 2005) (De Fabo 2005).

3.2 Pénétration des UV à travers la peau

Chez l'homme, les cibles premières des UV sont la peau et les yeux. Il est important de souligner que plus la longueur d'onde est élevée, plus les UV pénètrent profondément à travers ces tissus (Tyrrell 1995). Dans l'épiderme, couche la plus externe de la peau, les UV sont absorbés ou subissent un phénomène de réflexion. Environ 15% des UV-B parviennent aux couches profondes de l'épiderme et 50% des UV-A atteignent le derme (**Figure 3**).

Les UV-A (320-400 nm), dont l'intensité ne varie pas pendant la journée, sont les moins énergétiques. Ceux-ci pénètrent dans la peau très profondément, jusqu'au derme inférieur et sembleraient être responsables du bronzage immédiat. Les UV-A, principaux responsables du photo-vieillissement, modifient les fibres de la peau situées dans le derme, collagène et élastine, qui assurent respectivement la fermeté et l'élasticité de la peau. La surexposition ou les expositions répétées mènent à une accélération du vieillissement de la peau, traduit *in vivo* par l'apparition de rides et ridules, un affaissement de la peau et un épaissement du derme.

On a longtemps pensé que les UVA ne causaient aucun dommage à long terme mais de récentes études ont suggéré qu'ils pouvaient également augmenter le développement des tumeurs de la peau (Bachelor and Bowden 2004).

Les UV-B (290-320 nm), plus énergétiques que les UV-A mais moins énergétiques que les UV-C, sont considérés comme les plus nocifs auxquels notre organisme est exposé. Ils pénètrent principalement dans les différentes couches de l'épiderme et s'enfoncent jusqu'au derme supérieur. Les UV-B sont aussi responsables du bronzage et favorisent également le vieillissement prématuré de la peau.

Les UV-C (190-290 nm) sont les plus énergétiques et potentiellement les plus nocifs, mais heureusement les UV-C d'origine solaire n'atteignent pas la surface de la terre. Les UV-C artificiels sont utilisés dans les hôpitaux ainsi que dans les laboratoires pour stériliser les locaux, les instruments, l'eau et l'air conditionné car ils peuvent détruire les bactéries et les virus. Le pouvoir germicide des UV-C dépend de la longueur d'onde émise. Ce sont les longueurs d'onde comprises entre 200 et 280 nm qui sont les plus germicides.

3.3 Les ultraviolets et leurs effets

3.3.1 Les effets généraux

Les ultraviolets entraînent de multiples effets et ce, à différents niveaux.

A un niveau macroscopique, les effets visibles les mieux connus suite à une exposition excessive aux UV est l'érythème, rougissement de la peau appelé plus communément « coup de soleil » et le bronzage. L'érythème est dû à la dilatation des vaisseaux sanguins de la peau qui augmente le flux sanguin, ce processus est lié surtout aux UV-B et un peu aux UV-A. Le bronzage est la conséquence de la stimulation de la production de mélanine par les UV.

A un niveau cellulaire, les UV provoquent l'apparition de différentes caractéristiques comme une perte du contact intercellulaire, un changement morphologique, des boursoflures (blebs) en surface de la cellule, etc.

Les UV ont une action pro-inflammatoire car ils provoquent la sécrétion de cytokines (IL-1, TNF α , IFN γ) notamment par les kératinocytes et d'autres signaux inflammatoires générés par d'autres types cellulaires.

Les UV affectent le système immunitaire en diminuant la capacité de reconnaître un corps étranger et d'engager une réponse immunitaire des cellules de Langerhans et des lymphocytes ; ce phénomène est appelé immunosuppression (Ichihashi, Ueda et al. 2003).

Les effets les plus importants sont provoqués au niveau moléculaire, l'ADN représente la cible principale mais les protéines et les lipides peuvent également être affectés.

3.3.2 Les effets sur l'ADN

Lorsqu'une molécule organique absorbe un rayonnement ultraviolet, elle devient excitée. Un de ses électrons est alors transféré sur une orbitale supérieure. La molécule excitée, devenue un radical libre, peut réagir avec beaucoup d'autres molécules, menant parfois à des réactions en chaîne. Ce processus est nommé photosensibilisation et les molécules capables d'absorber les rayons, des photosensibilisateurs ou chromophores.

Plusieurs constituants cellulaires, par exemple l'ADN, les flavines et les porphyrines, mais aussi des médicaments comme les tétracyclines peuvent réagir comme chromophores à l'intérieur de la cellule. L'état excité de ces chromophores peut être considéré comme des

espèces génotoxiques similaires aux espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène telles que le radical hydroxyl ou l'oxygène singulet.

Les dommages au niveau de l'ADN causés par une exposition aux ultraviolets se divisent en deux catégories :

- les dommages directs où les ultraviolets induisent eux-mêmes des dégâts au niveau de l'ADN, principalement générés par les UV-B
- les dommages indirects engendrés par les composés chimiques intermédiaires provenant du stress oxydatif provoqué par les UV-A mais aussi les UV-B.

Les dommages directs ou réaction de type I

Le spectre d'absorption de l'ADN couvre les UV-B et les UV-C. Cela signifie que l'énergie d'excitation des rayons UV-B et UV-C est supérieure ou égale à l'énergie nécessaire pour exciter l'ADN. Néanmoins, les UV-C n'entrent pas en contact avec notre organisme puisqu'ils sont arrêtés par la couche d'ozone. Les UV-B peuvent donc être directement absorbés par l'ADN des cellules, entraînant des réactions de dimérisation de bases pyrimidiques, thymine et cytosine. Deux photoproduits majeurs, formés à partir de liens covalents entre des pyrimidines voisines, apparaissent au niveau de l'ADN : des dimères de pyrimidines cyclobutane et des pyrimidines (6-4) pyrimidone. Ces photoproduits induisent des mutations pouvant mener au développement de cancers.

Parmi les dimères de pyrimidines cyclobutane, les dimères thymine-cytosine (TC) et les dimères cytosine-cytosine (CC) sont connus pour être les plus mutagènes. Les mutations de type TC → TT et CC → TT sont d'ailleurs souvent retrouvées dans le gène de p53, impliqué dans les cancers induits par les UV (Ichihashi, Ueda et al. 2003).

Les dommages indirects ou réaction de type II

Les UV-A, moins énergétiques, ne sont pas directement absorbés par l'ADN mais peuvent exciter des chromophores endogènes, c'est-à-dire des constituants cellulaires naturels, ou exogènes, comme des médicaments. Ce phénomène est également possible lors d'expositions aux UV-B. Ces chromophores excités sont alors capables d'induire des dommages au niveau de l'ADN. Ils n'agissent donc pas directement au niveau de l'ADN mais permettent la formation de molécules réactives capables d'endommager celui-ci.

Les réactions de type II impliquent souvent la molécule d'oxygène qui génère de l'oxygène singulet et des anions superoxydes grâce à un transfert d'énergie réalisé avec les UV. L'oxygène singulet peut réagir directement avec l'ADN alors que l'anion superoxyde en est incapable mais contribue à la formation de radicaux hydroxyles, bien plus réactifs que l'oxygène singulet. D'autres molécules réactives peuvent également être générées par les UV, comme des radicaux thyles, peroxydes, alkyls qui peuvent endommager l'ADN ou d'autres molécules.

Conséquences des dommages de l'ADN

Lorsqu'une cellule est exposée à un stress entraînant des dommages à l'ADN, elle arrête son cycle de division de façon temporaire pour permettre la réparation de l'ADN et éviter ainsi l'apparition de mutations dans les générations suivantes de cellules. Si la fréquence des dommages n'est pas trop élevée et/ou que la réparation est efficace, la prolifération cellulaire reprend ; sinon la plupart des types cellulaires dont les kératinocytes enclenchent un processus de mort programmée, l'apoptose.

3.4 Activation de voies intracellulaires par les UV : Voie du récepteur EGF

Des expositions répétées aux UV induisent une production plus élevée d'espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène intracellulaire, menant à un stress oxydatif. Il a été montré qu'en réponse aux UV, le stress oxydatif jouait un rôle important dans l'activation du récepteur EGF (Peus, Vasa et al. 1998). Les UV ainsi que le stress oxydatif engendré semblent pouvoir empêcher la déphosphorylation du récepteur de l'EGF en inhibant les phosphatases (Knebel, Rahmsdorf et al. 1996), ce qui entraîne une activation du récepteur indépendamment du ligand.

Le récepteur EGF ainsi activé par les UV et l'augmentation des espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène stimuleraient l'initiation de la cascade des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Rittie and Fisher 2002).

Ingo Haase et son équipe ont montré en 2003 que la forme et la migration du kératinocyte ainsi que le processus de réparation de l'épiderme suite à une blessure étaient régulés par des voies de transduction du signal dépendantes de l'EGF ; suggérant un rôle important du récepteur de l'EGF dans ces mécanismes (Haase, Evans et al. 2003).

3.4.1 Le récepteur de l'epidermal growth factor (EGF)

Description du récepteur

Le récepteur de l'« Epidermal Growth factor » ou EGF fait partie de la famille des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase. La famille de ces récepteurs est composée de quatre membres : HER1, HER2, HER3 et HER4 (Human EGF Receptor)(Yarden and Sliwkowski 2001).

La structure du récepteur EGF se présente en quatre parties : (**Figure 4**)

- Un domaine extracellulaire riche en résidus cystéine dont la partie centrale lie le ligand,
- Un domaine transmembranaire hydrophobe
- Un domaine intracellulaire avec une zone à activité tyrosine kinase
- Un domaine COO-H terminal, possédant des sites de phosphorylation sur tyrosines qui serviront de sites d'ancrage pour des protéines à domaine SH2 (Src Homology 2)

Le récepteur EGF, lorsqu'il est activé, induit des cascades de transduction du signal complexes dans la cellule, modulant la prolifération, la survie, l'adhésion, la migration et la différenciation. La structure définie au point précédent permet une transmission des signaux extracellulaires vers l'intérieur de la cellule à travers des voies complexes et variées, et qui aboutissent à l'activation de gènes permettant une réponse cellulaire adaptée au stimulus.

Description des ligands

Les ligands du récepteur EGF forment un vaste ensemble de facteurs de croissance impliqués dans une grande variété d'effets et appartenant à la super famille de l'EGF. De plus en plus, les récepteurs EGF et leurs ligands sont considérés comme faisant partie d'un immense réseau qui permet à la cellules de réagir en fonction de son milieu (Zaczek, Brandt et al. 2005).

Tous ces ligands sont des dérivés de précurseurs transmembranaires. La partie extracellulaire est clivée libérant ainsi une forme mature et soluble. Cette forme mature contient une zone, nommée EGF-like, qui constitue le domaine de liaison au récepteur. Cette zone, très conservée, est caractérisée par la présence de six cystéines formant les trois ponts disulfures caractéristiques du domaine (Plowman, Whitney et al. 1990).

Transduction du signal du récepteur EGF

La liaison du ligand sur le domaine extracellulaire de leur récepteur induit la dimérisation puis l'activation du récepteur. En fonction du ligand, il peut s'agir d'une homodimérisation (ex : HER1/HER1) ou d'une hétérodimérisation engageant deux récepteurs différents appartenant à la même famille. Un grand nombre de combinaisons est alors possible.

Cette dimérisation provoque un changement conformationnel des récepteurs qui aboutit à l'activation du domaine tyrosine-kinase intracellulaire (Lemmon, Ladbury et al. 1994). Les tyrosines du domaine C terminal de chacun des récepteurs sont alors phosphorylées de manière croisée (cross phosphorylation).

Cette phosphorylation permet le recrutement de complexes de signalisation composés d'enzymes cytoplasmiques et de protéines adaptatrices telles que les protéines portant un domaine Src Homology 2 (SH2). Celles-ci vont initier différentes voies de transduction, comme celle des MAPK.

Un phénomène de désensibilisation, diminuant la phosphorylation des récepteurs, et une internalisation des récepteurs, aboutissent à une diminution de la quantité de récepteurs en membrane, ce qui régule la réponse. Les récepteurs sont internalisés par endocytose et les contenus des endosomes sont ensuite dégradés dans les lysosomes. Le phénomène de désensibilisation fait intervenir principalement un mécanisme qui inhibe l'activation des récepteurs : l'activation des tyrosines phosphatases permettant la déphosphorylation des récepteurs (Rittie and Fisher 2002).

Il est important de souligner que le nombre de récepteurs activés a une influence sur la réponse cellulaire (Buss, Chouvet et al. 1984).

3.4.2 Les MAPK

(Figure 5)

Les voies des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) peuvent être enclenchées par un grand nombre de signaux externes, menant à un large panel de réponses cellulaires comme la croissance, la différenciation, l'inflammation et l'apoptose. Toutes ces voies forment un réseau qui permet à la cellule de percevoir les changements de son environnement et d'adapter son comportement à celui-ci.

Ces cascades jouent un rôle clé dans la régulation de l'expression des gènes, ce qui les rend très importantes. Notons que ces cascades sont très conservées dans l'évolution ; on les retrouve chez tous les eucaryotes.

Activation des voies MAPK

L'activation des voies MAPK se déroule au niveau de la membrane. Lorsqu'un récepteur transmembranaire de type tyrosine kinase dans le cas du récepteur de l'EGF est activé par sa liaison à son ligand, ce récepteur devient phosphorylé sur ses résidus tyrosines par autophosphorylation.

Ces tyrosines phosphorylées permettent de recruter des protéines adaptatrices possédant un domaine SH2 (src homology 2) comme Shc, qui vont être phosphorylées sur un résidu tyrosine. La protéine adaptatrice Grb2, possédant un domaine SH2, est alors recrutée, établit un contact et va permettre le recrutement par son domaine SH3 (src homology 3) du facteur d'échange de GTP nommé SOS. Celui-ci catalyse l'échange de GDP par GTP au niveau de la petite protéine G, Ras. Ce complexe favorise le recrutement d'une MAPK kinase kinase à la membrane, qui va être activée.

Intervient alors un phénomène de transmission du signal qui se déroule dans le cytoplasme et qui est organisé en un module de trois kinases : les MAPK, les MAPKK (ou

MEK, MKK ou MAPK kinase) et les MAPKKK (MEK kinase ou MAPK kinase kinase). Les protéines MAPK sont des sérine/thréonine kinases, ce qui signifie qu'elles peuvent phosphoryler les autres protéines sur leurs résidus sérine ou thréonine.

Ces voies suivent un principe commun (Schaeffer and Weber 1999). Cette transmission est une suite de phosphorylations réalisée par les protéines MAPK. Une MAPKKK, lorsqu'elle est activée, va phosphoryler une MAPKK, qui devient active et qui va phosphoryler et activer une MAPK. Celle-ci va phosphoryler des substrats tels que les facteurs de transcription ou d'autres protéines impliquées dans la réponse.

Stimulus → MAPKKK → MAPKK → MAPK → Réponse cellulaire

Voies multiples

Chez les mammifères, trois cascades majeures des MAPK ont été identifiées : MAPK/ERK (extracellular signal regulated kinase), SAPK/JNK (c-Jun N-terminal kinase) et p38^{MAPK}. Celles-ci ne semblent pas être impliquées dans les mêmes phénomènes.

En effet, la voie classique de ERK semble impliquée plutôt dans la croissance cellulaire, alors que les voies de JNK et p38 seraient activées en réponse à des agents de stress tels que l'inflammation, l'apoptose (Schaeffer and Weber 1999) ou encore par certaines cytokines (réf).

3.5 Défense contre les UV : Les protéines de choc thermique (Heat shock protein ou Hsp)

Les protéines de choc thermique représentent un groupe de protéines dont l'expression est augmentée suite à un stress, le premier de ces stress décrit étant le choc thermique. Elles sont généralement appelées selon l'abréviation anglaise Hsp pour "Heat Shock Protein". Cinq grandes familles constituent les principales Hsp, celles-ci ont été classées selon le poids moléculaire de la protéine sur gel dénaturant SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) et selon une homologie de séquence.

La majorité des Hsp sont impliquées dans la défense cellulaire contre des stress de différentes natures : stress oxydatif, choc thermique, hyperosmolarité, cytokines inflammatoires et dans ce cas, les UV. Une variété de stress internes et externes peuvent engendrer un effet protéotoxique, menant à une augmentation de l'abondance de protéines dépliées. Cette augmentation peut avoir de graves conséquences car elle augmente les risques de formation d'agrégats intracellulaires, ce qui peut mener à la mort cellulaire (Kampinga 2006).

Ces protéines peuvent former des complexes oligomériques pouvant agir comme protéine "chaperon", lorsqu'un stress survient, en liant les protéines non dépliées et en les présentant aux Hsp dépendantes de l'ATP (Adénosine Triphosphate) qui sont les Hsp70, Hsp40 et Hsp90. L'ATP est une molécule utilisée chez les animaux et les plantes pour fournir de l'énergie aux réactions chimiques.

Lorsque les protéines présentent des dommages irréversibles, celles-ci sont présentées au protéasome par les Hsp (Arrigo 2001).

3.5.1 Heat shock protein 27 (Hsp27)

Hsp27 (heat shock protein 27) est une protéine hautement conservée qui appartient à la famille des « heat shock protein » (Hsp) et plus particulièrement aux « small heat shock protein » ou sHsp. Il a été mis en évidence que la forme phosphorylée de la protéine de choc

thermique Hsp27 était impliquée dans la réponse des kératinocytes humains exposés aux UV-B (Wong, Shi et al. 2000).

Rôles

En réponse à un stress, les cellules induisent l'expression des « heat shock protein » comme celle de Hsp27. La surexpression de Hsp27 peut conférer à la cellule une résistance contre les chocs thermiques et contre les stress oxydatifs ; mais elle semble moins efficace que l'augmentation de la proportion de protéines Hsp27 phosphorylées. Ce qui suggère que hsp27 est activée par la phosphorylation (Lavoie, Lambert et al. 1995).

D'autre part, Hsp27 est impliquée dans plusieurs voies de la transduction du signal, l'arrêt de la croissance et la différenciation (Michishita, Hirayoshi et al. 1991). Il a été montré que Hsp27 était liée au processus de différenciation des kératinocytes. La première expérience a mis en évidence une augmentation allant en s'accroissant du marquage immunohistochimique de Hsp27 dans les couches suprabasales de l'épiderme.

Finalement, différentes études ont mis en évidence des rôles plus spécifiques comme la régulation de la réorganisation du cytosquelette (Guay 1997). La phosphorylation de Hsp27 jouerait un rôle dans la stabilisation des filaments d'actine (Wong, Shi et al. 2000).

Activation et relocalisation de Hsp27

Hsp27 peut être phosphorylée en quelques minutes après un stress comme un choc thermique contrairement à l'accumulation de la forme non phosphorylée qui apparaît quelques heures après. Différents sites de phosphorylation sur des sérines ont été identifiés : sérine 15, sérine 78 et sérine 82 ; cette dernière correspondant à la forme majoritaire.

Des études ont mis en évidence que l'exposition à différents facteurs de stress comme les UV peuvent entraîner la phosphorylation de Hsp27 (Nozaki, Takehana et al. 1997). Des facteurs de croissance et de différenciation peuvent également intervenir ; la phosphorylation ayant lieu sur les mêmes résidus.

Il semblerait que Hsp27 se retrouve en aval de la cascade de $p38^{\text{MAPK}}$ impliquée notamment dans la signalisation induite par IL-1, les stress et les chocs thermiques (Rouse, Cohen et al. 1994). Pour rappel, la voie de $p38^{\text{MAPK}}$ semble impliquée dans la réponse à des agents de stress tels que l'inflammation, l'apoptose ou les UV (Schaeffer and Weber 1999). L'utilisation d'un inhibiteur de $p38^{\text{MAPK}}$ diminue la phosphorylation de Hsp27 induite par les UVB, mais également suite à un stress oxydatif au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et au choc thermique (Wong, Shi et al. 2000).

4 Le modèle de stress répétés et sub-létaux d'UV-B

Le but de ce modèle est d'étudier la réponse à long terme de kératinocytes humains suite à des expositions sub-létales répétées d'UV-B.

Les cellules utilisées proviennent d'une lignée de kératinocytes humains immortalisés (IHK ou N-htert). Ceux-ci sont immortalisés par l'expression d'origine ectopique de la sous-unité catalytique de la télomérase et de plus, n'expriment pas p16^{INK4a}, qui est un inhibiteur de complexe cycline-kinase dépendante de cycline. Ces kératinocytes conservent néanmoins leur potentiel de différenciation (Rheinwald and Green 1975).

4.1 Modèle des stress, étude des biomarqueurs et étude protéomique.

4.1.1 Modèle des stress

La première étape a consisté à mettre au point un modèle d'expositions à des doses répétées et sub-létales d'UV-B. Pour cela, Véronique Vallery a tout d'abord déterminé les conditions de stress sub-létales qui entraînent, à long terme, l'arrêt de la prolifération sur la lignée de kératinocytes N-htert. Ce modèle est composé de huit stress à des doses sub-létales de 300 mJ/cm² d'UV-B. Un stress est réalisé quatre fois par jour et cela, pendant 2 jours. Ces deux jours de stress sont suivis par deux jours de récupération (**Figure 6**).

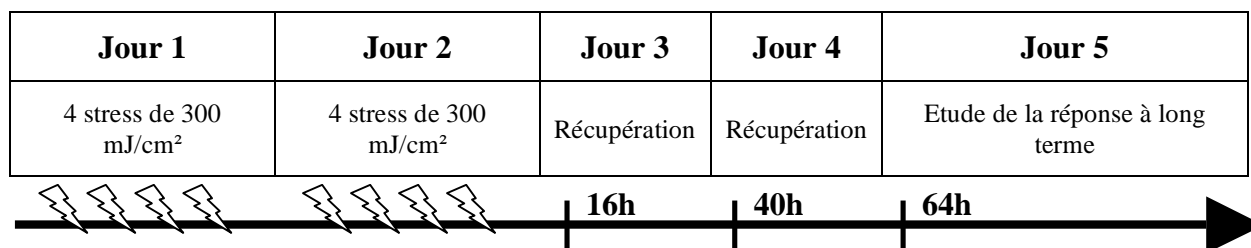


Figure 6 Modèle utilisé pour l'étude de l'abondance des protéines impliquées dans la réponse à long terme des kératinocytes exposés aux UV-B pendant la phase de récupération après stress

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales d'UV-B (300 mJ/cm² par stress), réparties en 4 fois par jour pendant deux jours. Les cellules contrôles sont traitées en parallèle mais en l'absence d'UV-B. Une étude à long terme a été réalisée 64 heures après le dernier stress et l'étude protéomique à 16, 40 et 64 heures après le dernier stress (temps dits longs).

Une étude à long terme est réalisée 64 heures après le dernier stress, c'est-à-dire après deux jours de récupération. Une morphologie étalée des cellules exposées aux UV-B, un arrêt de la prolifération et une augmentation du niveau d'expression en ARNm et en protéine de p21^{WAF-1} constituent les premières observations de cette étude. Il faut savoir que p21^{WAF-1} est une kinase inhibitrice impliquée dans le cycle cellulaire, celle-ci inhibe les cycline-CDK (cycline dependent kinase), ce qui mène à un arrêt cellulaire.

De plus, l'involucrine est également induite dans les cellules exposées aux UV-B. Son implication dans le processus de différenciation des kératinocytes est connue, elle constitue d'ailleurs un marqueur tardif de ce processus. Notons que la sécrétion de la métalloprotéase matricielle MMP-9 (Matrix Metalloproteinase 9) dans le surnageant des cellules exposées aux UV-B est augmentée.

Enfin, la phosphorylation de la protéine "chaperon" Hsp27 (heat shock protein), impliquée dans la défense au stress (Kampinga 2006), et une augmentation du contenu en protéines oxydées ont également été mises en évidence.

4.1.2 Etude protéomique

Une étude protéomique a été réalisée ensuite afin de mieux caractériser ce modèle. La technique choisie a été celle des gels bidimensionnels (2D-DIGE) où les protéines sont marquées par une sonde fluorescente. 41, 34 et 30 spots présentant une variation significative d'abondance protéique entre les cellules exposées aux UV et les cellules contrôles ont été mis en évidence après, respectivement, 16, 40 et 64 heures de récupération. L'identification des protéines a été effectuée par spectrométrie de masse.

4.1.3 Etablissement des hypothèses de travail de ce mémoire

Cette analyse a mené à l'identification de nombreuses protéines qui sont impliquées dans de multiples voies telles que le cycle cellulaire, le processus d'inflammation, la différenciation, le cytosquelette et son réarrangement, la défense du stress, le métabolisme général et énergétique, les processus de transcription et traduction. Parmi ces identifications, plusieurs protéines intéressantes ont été sélectionnées sur base de leur rôle dans la cellule et par rapport au modèle de stress aux UV-B. Nous en retiendrons trois qui sont impliquées dans les changements du cytosquelette et qui nous ont particulièrement interpellés puisque les cellules deviennent plus étalées et parfois allongées après exposition aux UV-B. L'augmentation d'abondance de ces trois protéines à 16 heures après exposition des cellules aux UV-B a pu être confirmée par western blot.

Ces trois protéines sont CapG (capping protein actin filament gelsolin like), la kératine 8 et la forme phosphorylée sur la sérine 82 de Hsp27. CapG, protéine de coiffe de l'actine et la kératine 8, faisant partie du cytosquelette des kératinocytes, voient leur abondance respective augmenter de 1,6x et 1,5x après que les cellules aient récupéré pendant 16 heures après exposition aux UV-B. L'abondance de la forme phosphorylée sur la sérine 82 de la protéine de choc thermique Hsp27 augmente de 1,7x après 16h de récupération chez les cellules stressées.

Notons que la kératine 8 peut être confondue avec la kératine 6 car elles comportent beaucoup de similarité de séquence. Nous allons donc nous intéresser également à cette dernière.

4.2 Les protéines étudiées

La phosphorylation de Hsp27 en réponse aux UV-B a déjà été mise en évidence (Wong, Shi et al. 2000) et a été développée au point 3.4. Nous allons approfondir la description des deux autres protéines étudiées au cours de ce mémoire, pour rappel : les kératines 8 et 6, et CapG.

4.2.1 Les protéines du cytosquelette : Kératine 6 & 8

L'étude protéomique par gels 2D a mis en évidence une augmentation de l'abondance des kératines 8 et 6 dans les cellules exposées aux UV-B. Celles-ci présentant une homologie de séquence très forte, rendant leur identification spécifique.

La kératine 8

La kératine 8 est exprimée préférentiellement dans les épithéliums simples glandulaires et forme avec la kératine 18 des filaments intermédiaires (Coulombe and Omary 2002). Une particularité est que les kératines 8 et 18 persistent dans les cellules tumorales provenant de divers épithéliums, suggérant un rôle dans le développement des tumeurs. Il existe également de nombreux exemples d'induction inappropriée de l'une ou l'autre de ces

deux formes de kératines épithéliales simples dans les tumeurs de tissus qui ne produisent habituellement pas ces protéines (Coulombe and Omary 2002).

Phosphorylation de la kératine 8

Deux sites de phosphorylation de la kératine 8 ont été mis en évidence : sur les résidus sérine-73 et sérine-431 (Ku and Omary 1997).

Pour la phosphorylation sur la sérine-73, il a été montré que plusieurs stress comme un choc thermique, une infection virale, l'apoptose entraînent une hyperphosphorylation de la kératine 8 (HK8). L'accumulation de cette forme peut représenter un marqueur de stress pour l'épithélium. Notons que cette phosphorylation se retrouve également lors de la mitose mais de façon moindre (Liao, Ku et al. 1997). La phosphorylation sur cette sérine constitue un moyen de régulation important qui aboutit à la réorganisation des filaments de kératine et semble médiée par p38 (Ku, Azhar et al. 2002).

Il a été observé que la phosphorylation de K8 sur la sérine-431 augmentait fortement après une stimulation avec de l'EGF. Cette phosphorylation semble médiée par la voie des MAPK (Ku and Omary 1997).

La kératine 6

Description

Il existe six isoformes de la kératine 6 qui sont codées par six gènes comportant des séquences nucléotidiques très proches. Ces isoformes sont appelées hk6a à hk6f. La hk6a est la plus exprimée dans la cellule suivie de hk6b ; les quatre autres étant très rares. La kératine 6 est très souvent exprimée en même temps que les kératines 16 et 17, avec lesquelles elle s'associe pour former des filaments intermédiaires (Coulombe and Omary 2002).

Rôle

En conditions normales, la kératine 6 ainsi que les kératines 16 et 17 sont faiblement exprimées dans l'épiderme. L'augmentation de son expression est observée dans diverses situations pathologiques comme des lésions cutanées, une différenciation anormale ou encore dans des épithéliums stratifiés en hyperprolifération. Certaines maladies associées à une hyperprolifération (psoriasis) ou à une différenciation anormale, peuvent induire également cette expression (Coulombe and Omary 2002).

Il a été montré qu'une forte induction des kératines 6, 16 et 17 est présente dans l'épiderme bordant la plaie lors du processus de cicatrisation. Cette observation suggère que ces kératines exercent un rôle spécifique qui ne peut pas être assuré par les kératines normalement exprimées. En effet, l'accumulation de ces kératines se fait au détriment de celles qui se trouvent dans le tissu en temps normal. Les observations les plus importantes concernant la kératine 6 proviennent du contexte de la cicatrisation. En effet, la présence de celle-ci ainsi que des kératines 16 et 17, et les changements d'expression de certains gènes caractérisent la « phase d'activation » des kératinocytes. Un changement morphologique, un allongement et une polarisation du kératinocyte, est alors visible, et caractérisent le kératinocyte activé.

4.2.2 Les protéines modulant le cytosquelette : CapG

La réorganisation du cytosquelette est impliquée dans une multitude de processus et fait intervenir de nombreuses protéines et notamment la superfamille des gelsolines. Cette superfamille contrôle le réseau d'actine en la coiffant, en la coupant et en l'assemblant. Les gelsolines, membres de cette superfamille, comportent au moins six membres : villine,

adseverine, Cap G, advilline, supervilline et flightless I. Différentes études ont montré que ces protéines, en plus de leurs rôles dans le remodelage des filaments d'actine, sont impliquées dans de nombreux processus tels que la mobilité cellulaire, l'apoptose, la régulation de la phagocytose et la régulation de l'expression des gènes (Silacci, Mazzolai et al. 2004).

Rappel : L'actine

L'actine est présente dans la cellule sous deux formes : une forme glomérulaire (monomère) et une forme filamenteuse (polymère). Les microfilaments d'actine, composés de doubles hélices d'actine, sont polarisés. Le microfilament d'actine possède une extrémité effilée et une extrémité barbelée. La fréquence d'incorporation de monomères d'actine, permettant l'élongation du microfilament par polymérisation, est plus élevée au niveau de l'extrémité barbelée qu'à l'extrémité effilée (**Figure 7**).

Description et quelques particularités

CapG lie avec beaucoup d'affinité la terminaison barbelée des filaments d'actine, ce qui représente une propriété commune avec certaines gelsolines (Witke, Li et al. 2001).

Contrairement aux autres membres de la famille qui en possèdent six, CapG ne possède que trois domaines gelsolin-like. Cette protéine peut lier et coiffer les filaments d'actine mais est incapable de couper ces filaments, ce qui de nouveau l'oppose aux autres gelsolines qui possèdent les trois propriétés (Silacci, Mazzolai et al. 2004). Sa dernière particularité est qu'elle peut être localisée à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme (De Corte, Van Impe et al. 2004).

Rôles

CapG, en se liant à l'extrémité barbelée, empêche l'élongation des microfilaments d'actine (coiffe). La liaison de CapG à l'actine dépend de la concentration intracellulaire du calcium et se rompt lorsque cette concentration diminue. Cette liaison est donc réversible, ce qui augmente les possibilités de réguler la longueur des filaments en réponse aux fluctuations intracellulaires du calcium (Kwiatkowski 1999).

Un lien entre les gelsolines et la mobilité a pu être mis en évidence lors d'une étude portant sur des fibroblastes surexprimant ces protéines (Cunningham, Stossel et al. 1991). Une autre étude réalisée par l'équipe de Hui-Qiao Sun en 1995 a montré que la surexpression de CapG, pouvait mener à une augmentation de la mobilité chez les fibroblastes (Sun, Kwiatkowska et al. 1995).

L'implication de CapG dans la mobilité cellulaire chez les cellules endothéliales et une augmentation de l'abondance de CapG dans ces cellules exposées à des stress de cisaillement dus au flux sanguin ont été mises en évidence (Pellieux, Desgeorges et al. 2003). Les protéines de la famille des gelsolines sont d'ailleurs connues pour remodeler les filaments d'actine en réponse à un stimulus externe (Sun, Yamamoto et al. 1999).

4.3 Les protéines étudiées

Le premier objectif de ce mémoire est d'établir un profil d'abondance, de phosphorylation et de la localisation cellulaire de Hsp27, CapG et des kératines 6 et 8 au cours de la récupération après exposition aux UV-B.

5 Hypothèses de travail

5.1 Littérature

Différentes informations nous permettent d'établir des liens entre ces protéines, il est intéressant de souligner les observations suivantes :

- CapG est une protéine de coiffe de l'actine et est connue pour moduler l'architecture des filaments d'actine du cytosquelette en situation de stress (Sun, Yamamoto et al. 1999) et favoriser la mobilité cellulaire en réponse à un stimulus externe (Sun, Kwiatkowska et al. 1995) (Pellieux, Desgeorges et al. 2003),
- De plus, la phosphorylation de la kératine 8 présente chez les cellules exposées aux UV-B, également confirmée par Western blot, est observée dans différents contextes comme la mitose, les stress cellulaire et l'apoptose (Toivola, Zhou et al. 2002),
- Enfin, le rôle principal de Hsp27 dans la défense au stress est connu : Hsp27 maintient l'intégrité du cytosquelette (Guay, Lambert et al. 1997). Par ailleurs, des études ont montré que de nombreux facteurs de stress peuvent provoquer la phosphorylation de Hsp27, comme les UV (Nozaki, Takehana et al. 1997).

Le récepteur EGF, décrit dans les points précédents, présente certains liens avec les différentes protéines étudiées :

- Le récepteur EGF activé par les UV déclenche une voie menant à l'activation des MAPK dont p38^{MAPK} (Rittie and Fisher 2002),
- Le récepteur EGF semble également jouer un rôle dans la phosphorylation de la kératine 8 (Sérine 431) (Ku and Omary 1997),
- En outre, la forme, la migration du kératinocyte et le processus de cicatrisation de l'épiderme seraient régulés par des voies de transduction du signal dépendantes de l'EGF ; suggérant un rôle important du récepteur EGF dans ces mécanismes (Haase, Evans et al. 2003).

Par ailleurs, différentes observations indiquent que la voie des MAPK est souvent impliquée dans les effets induits par les UV. De plus, p38^{MAPK} a été mis en relation avec nos protéines d'intérêts à plusieurs reprises et pourrait être un bon candidat pour les étudier.

- D'abord, la phosphorylation de Hsp27 induite par différentes situations de stress dont les UV-B semble se trouver en aval de la cascade de p38^{MAPK} (Rouse, Cohen et al. 1994). L'utilisation d'un inhibiteur de p38^{MAPK} diminue la phosphorylation de Hsp27 induite par les UV-B chez des kératinocytes humains, mais également suite à un stress H₂O₂ (Wong, Shi et al. 2000),
- Ensuite, p38^{MAPK} semble responsable de la phosphorylation de la kératine 8 (Sérine 73), ceci menant à la réorganisation du cytosquelette après un stress (Ku, Azhar et al. 2002),
- Enfin, l'expression de l'involucrine est également régulée par la voie de p38^{MAPK} (Eckert, Crish et al. 2004).

5.2 Hypothèses de travail

Un modèle hypothétique rassemblant toutes ces informations a été proposé (**Figure 8**). Un des objectifs de ce mémoire est d'essayer d'établir un lien entre $p38^{MAPK}$, la kératine 8 et CapG tout en confirmant le lien avec Hsp27 et l'involucrine. Les voies des MAPK étant complexes, $p38^{MAPK}$ ne sera pas la seule protéine étudiée de cette catégorie, les protéines ERK et JNK seront également prises en compte dans les expériences (**Figure 8**).

5.2.1 Initiation de la voie

L'exposition au UV-B active le récepteur EGF qui va dimériser et s'autophosphoryler sur les résidus tyrosine grâce à son activité tyrosine kinase intrinsèque située dans son domaine cytoplasmique. Le récepteur activé déclenche ensuite une cascade de signalisation classique qui aboutit en aval à l'activation des MAPK (dont $p38^{MAPK}$) par phosphorylation (Rittie and Fisher 2002), comme vu précédemment.

5.2.2 Deux voies connues impliquant $p38^{MAPK}$

D'une part, la protéine $p38^{MAPK}$, lorsqu'elle est phosphorylée va migrer vers le noyau et induire l'expression du gène de l'involucrine par l'intermédiaire du facteur de transcription AP-1 (Eckert, Crish et al. 2004).

D'autre part, l'activation de $p38^{MAPK}$ mène à la phosphorylation de Hsp27 qui va permettre un réarrangement de l'actine (Guay, Lambert et al. 1997).

5.2.3 Hypothèses

Sur ces bases, deux voies hypothétiques impliquant $p38^{MAPK}$ sont proposées. Premièrement, l'activation de $p38^{MAPK}$ mènerait à la phosphorylation de la kératine 8 dans notre modèle d'exposition répétée aux UV sur les kératinocytes humains, ce qui aurait un impact sur l'organisation du cytosquelette que nous observons. A ce sujet, deux sites de phosphorylation seront étudiés, la phosphorylation sur les résidus sérine 73 et 431.

Deuxièmement, CapG serait induit par l'activation de $p38$ aboutissant à la réorganisation des filaments d'actine. Ces deux voies seraient susceptibles de mener au changement morphologique observé suite aux expositions aux UV-B.

Un des objectifs de ce mémoire est d'approfondir les voies de signalisation impliquées dans la réponse des kératinocytes aux UV-B et donc de tester ces deux hypothèses. Nous allons pour cela, étudier le profil d'abondance et de phosphorylation de $p38^{MAPK}$, ERK, JNK et du récepteur de l'EGF, au cours de la récupération après les stress aux UV-B. Nous comparerons ensuite les profils obtenus avec ceux de Hsp27, de CapG et des kératines 6 et 8. Nous pourrions peut-être ainsi mettre en évidence des corrélations temporelles entre ces protéines, ce qui représente une information importante pour l'étude par inhibition du rôle de $p38^{MAPK}$ dans cette voie, et qui sera réalisée ultérieurement.

6 Objectifs du mémoire

L'objectif de ce projet est de caractériser la réponse à long terme des kératinocytes exposés à des doses répétées sub-létales d'ultraviolets B selon un modèle mis au point au laboratoire sur une lignée de kératinocytes N-htert. Ce modèle est composé de huit expositions sub-létales d'UV-B (300 mJ/cm²) réparties en deux jours à raison de quatre stress par jour. Une étude protéomique a permis de mettre en évidence des protéines différenciellement exprimées dans les cellules exposées aux UV-B après 16, 40 et 64 heures de récupération. Parmi celles-ci, trois ont retenu notre attention : CapG, la kératine 8 et Hsp27.

Lors de ce mémoire, nous étudierons tout d'abord les profils d'abondance de ces protéines au cours de la récupération des cellules après les expositions aux UV-B. Notre deuxième objectif sera d'approfondir les voies de signalisation impliquées dans l'activation par phosphorylation de certaines de ces protéines en cherchant si un lien existe entre la kératine 8, CapG et les MAPK ERK, JNK et p38^{MAPK}.

Afin d'étudier les profils d'abondance de ces protéines par Western blot, nous effectuerons des extractions protéiques à différents temps pendant la récupération des cellules. Ces extractions seront réalisées à des temps assez courts de 30, 90 minutes et 3 heures après le dernier stress (appelés temps courts dans ce travail) et à plus long terme à 16, 40 et 64h après le dernier stress (appelés temps longs dans ce travail). Les observations faites aux temps longs nous permettront de caractériser la réponse à long terme aux UV-B et par ailleurs de confirmer ce qui a été mis en évidence lors de l'étude protéomique. Les résultats aux temps courts nous apportent des informations quant aux voies potentiellement impliquées dans l'apparition du phénotype suite aux stress UV-B. Les formes phosphorylées de la kératine 8 sur les sérines 73 et 431 seront également étudiées, la première pouvant intervenir dans les réponses aux stress (Liao, Ku et al. 1997), et la deuxième étant liée à la voie de l'EGF (Ku and Omary 1997). Le profil d'abondance de Hsp27 et de sa forme phosphorylée sur la sérine 82 sera également analysé par Western blot.

En parallèle, nous avons étudié par immunofluorescence l'abondance et la localisation cellulaire

- de la kératine 8 et de ses deux formes phosphorylées,
- de CapG en colocalisation avec l'actine ou pas,
- de Hsp27 phosphorylée sur la sérine 82 ou pas.

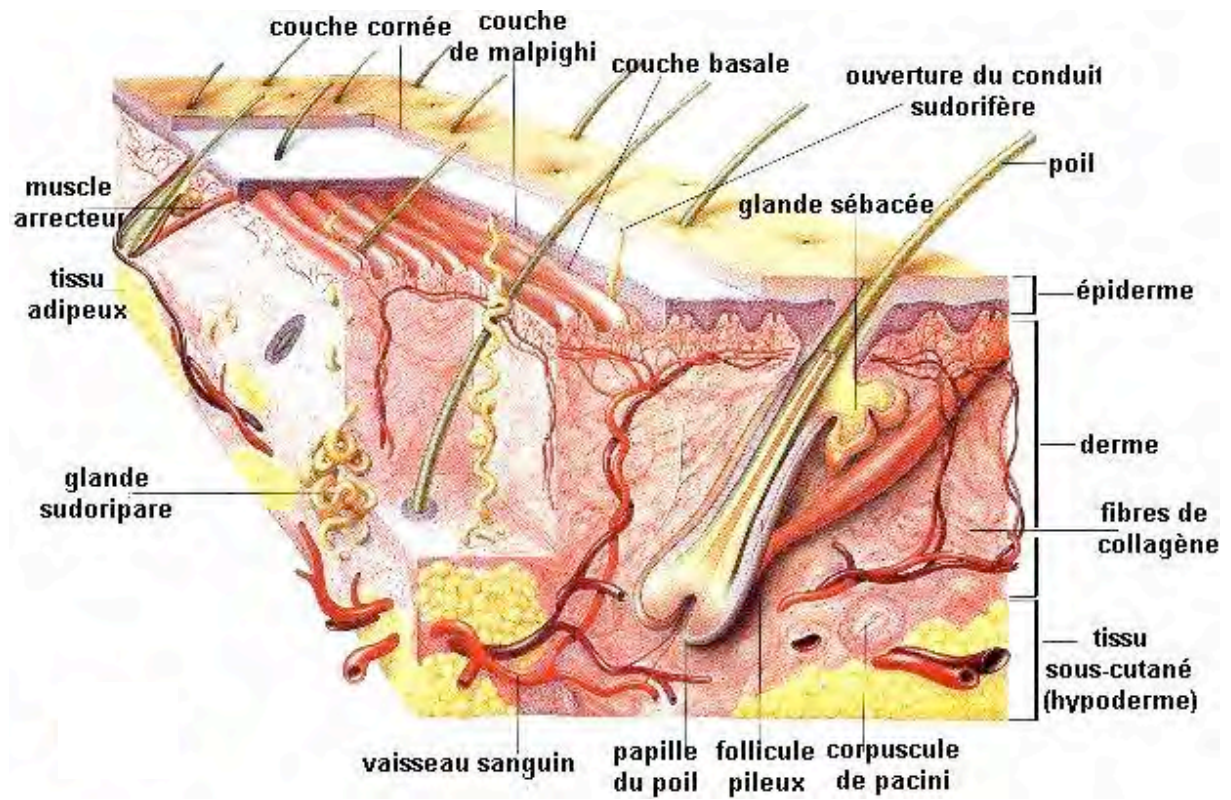


Figure 1 Schéma représentant la peau et son organisation en trois couches : Epiderme, derme et hypoderme.

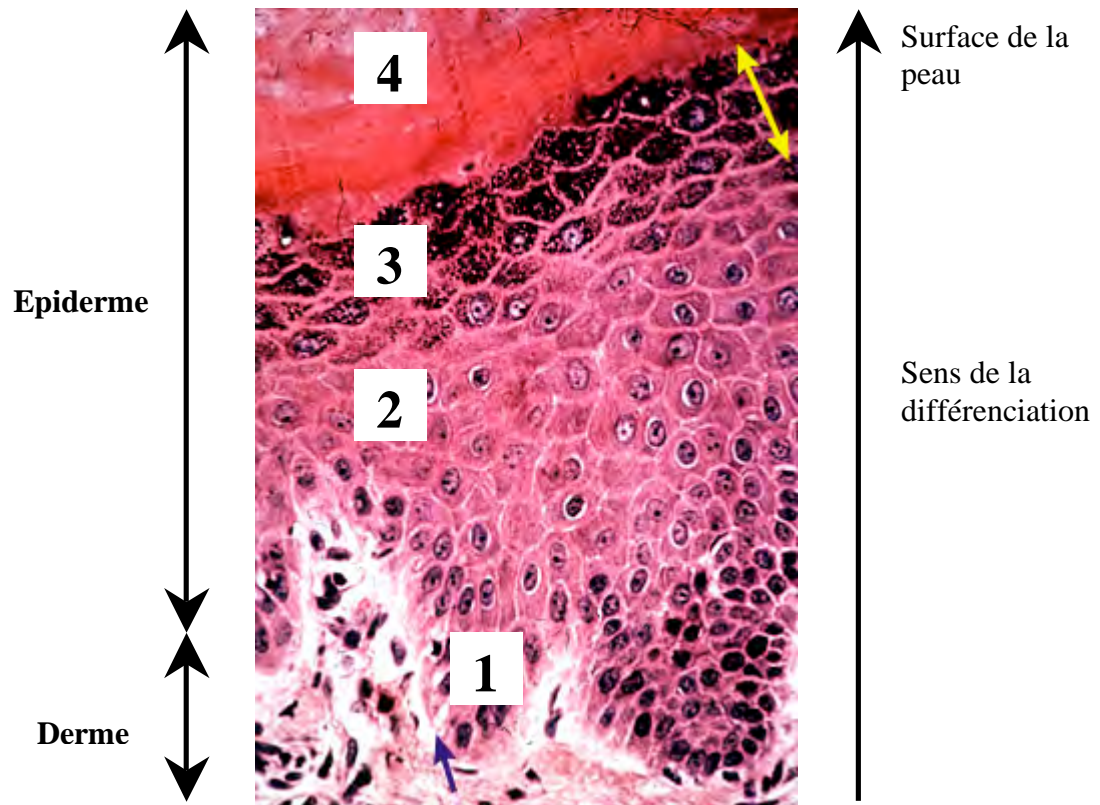


Figure 2 Coupe histologique de l'épiderme. Les kératinocytes entament un processus de différenciation qui aboutit à une organisation en 4 couches : basale (1), épineuse (2), granuleuse (3) et cornée (4).

<http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP2/peau&IMG37.html>

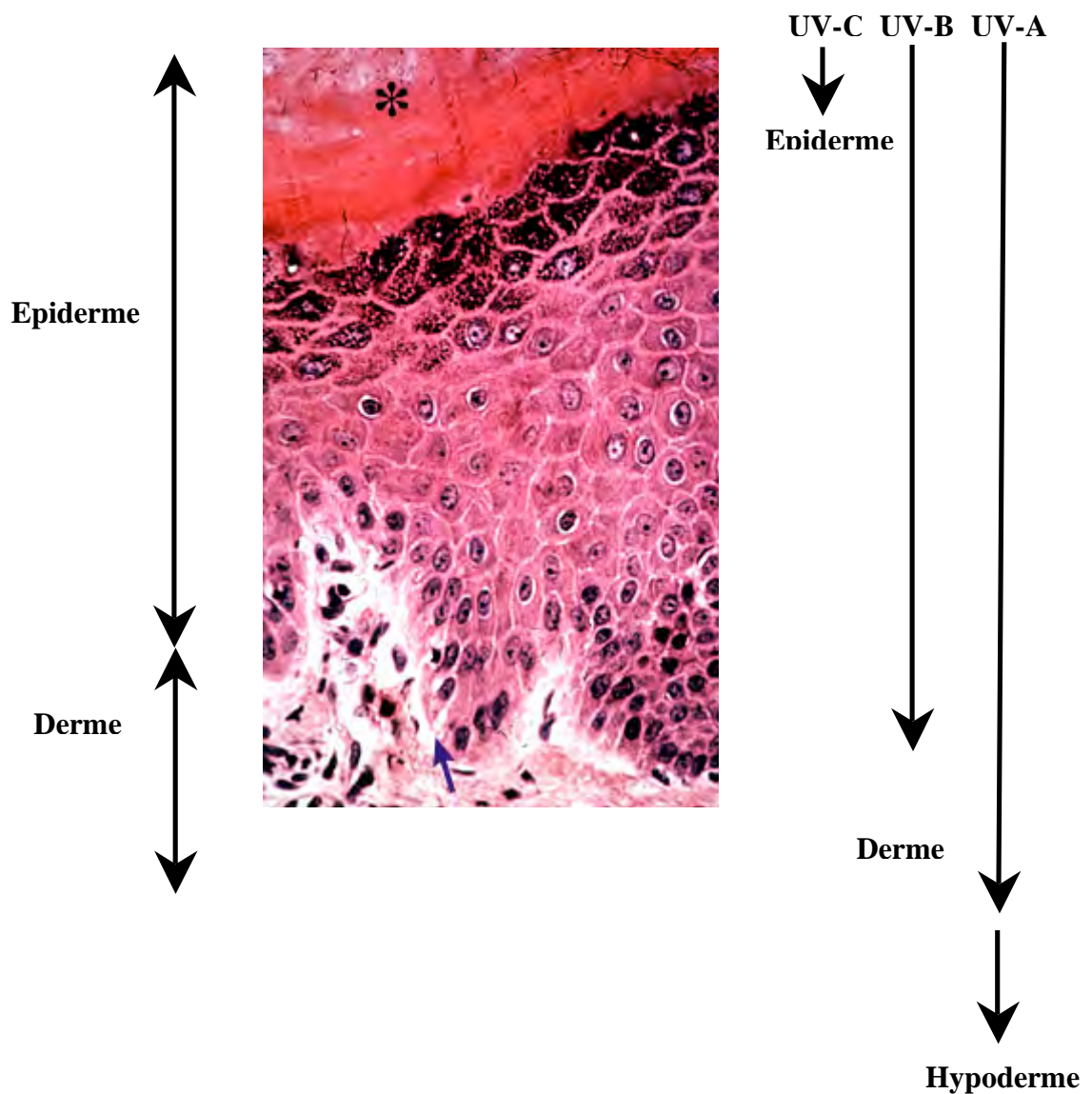


Figure 3 Pénétration des UV-A, UV-B et UV-C dans les couches de la peau.

Plus la longueur d'onde est grande, plus les UV pénètrent dans la profondeur de la peau. Les UV-A, UV-B et UV-C possèdent des longueurs d'onde situées respectivement entre 320 et 400 nm, entre 290 nm et 320 nm et entre 190 et 290 nm (Tyrrell 1995). Les UV-A atteignent l'hypoderme, les UV-B le derme supérieur et les UV-C l'épiderme.

<http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP2/peau&IMG37.html>

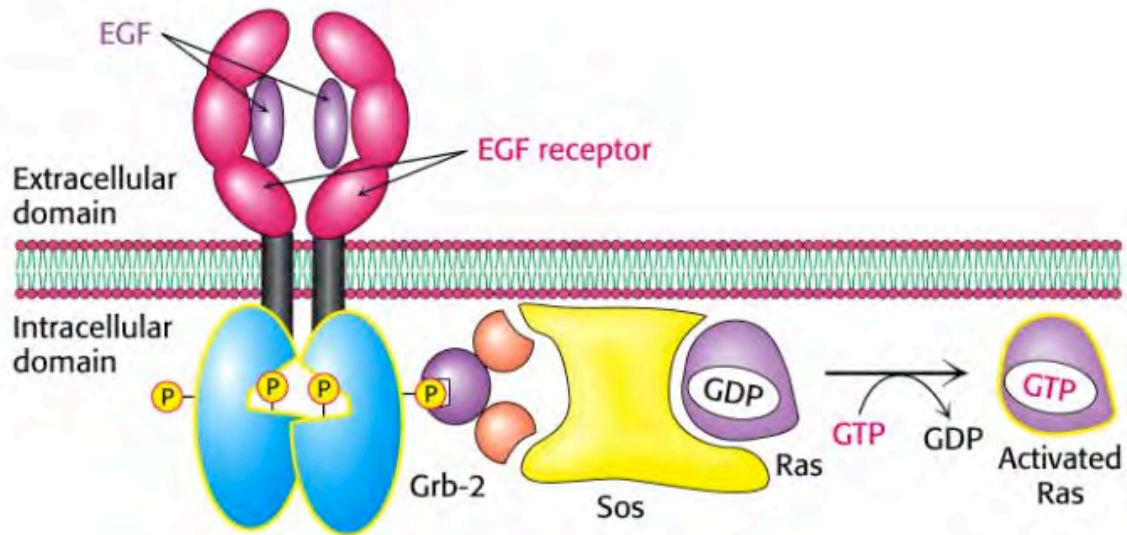


Figure 4 Le récepteur de l'EGF et son activation par l'EGF.

Lorsque l'EGF se lie au récepteur, celui-ci s'active, dimérise et s'autophosphoryle sur les résidus tyrosine. Les protéines adaptatrices possédant un domaine SH2 (src homology 2), telles que Grb-2, sont recrutées au niveau des tyrosines phosphorylées. Le facteur d'échange de GTP, nommé SOS, se lie alors au domaine SH3 (src homology 3) de Grb-2. Celui-ci va permettre l'échange de GTP en GDP de la petite protéine G, Ras et ainsi, l'activer.

<http://oregonstate.edu/instruction/bb450/stryer/ch15/Slide60.jpg>

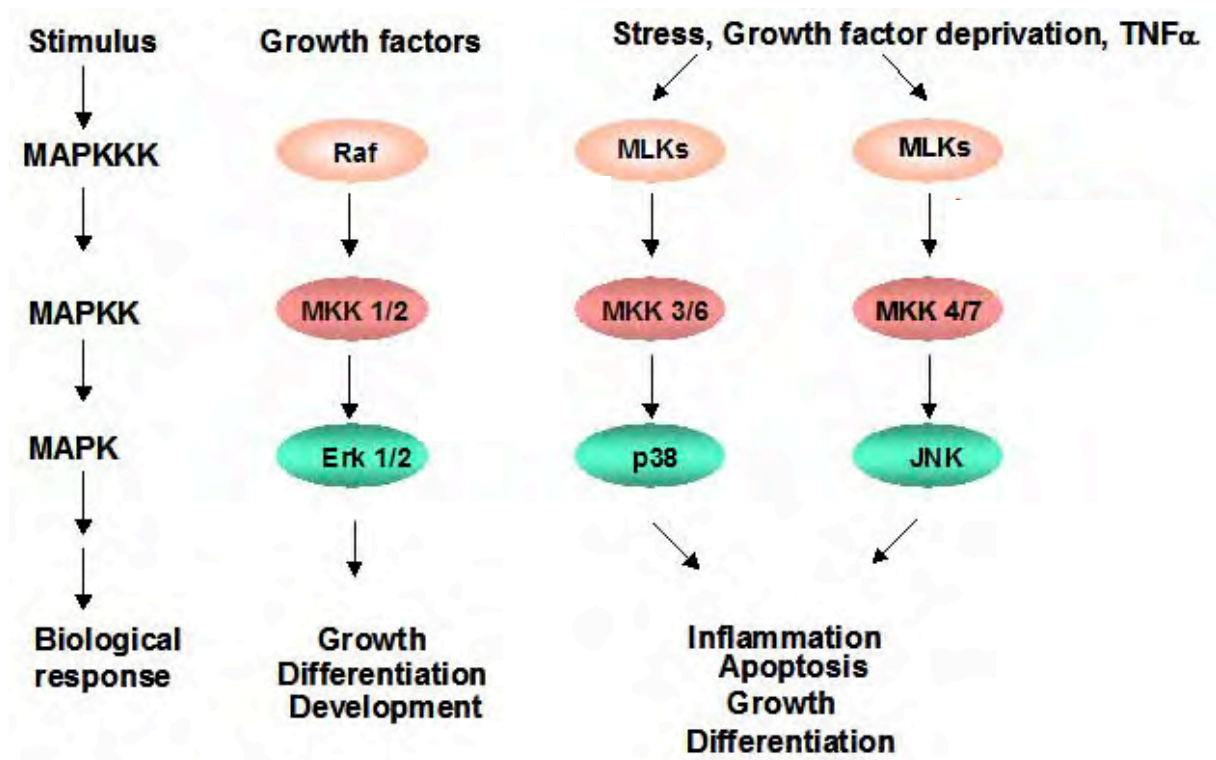


Figure 5 Les trois voies majeures des MAPK chez les mammifères.

Les voies sont organisées en un module de trois kinases : les MAPK, les MAPKK (ou MEK, MKK ou MAPK kinase) et les MAPKKK (MEK kinase ou MAPK kinase kinase). La transmission du signal est une suite de phosphorylations réalisée par les protéines MAPK. Une MAPKKK, lorsqu'elle est activée, va phosphoryler et activer une MAPKK, et qui va phosphoryler et activer une MAPK. Celle-ci va phosphoryler des facteurs de transcription ou d'autres protéines impliquées dans la réponse. La voie classique de ERK semble impliquée dans la croissance cellulaire et les voies de JNK et p38 seraient activées en réponse à des stress tels que l'inflammation, l'apoptose etc.

<http://www.bch.msu.edu/faculty/gallo/mapk-pathways-new.jpg>

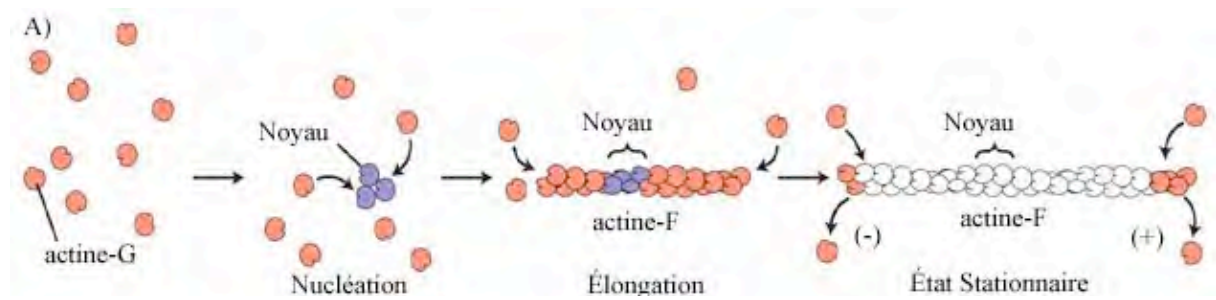


Figure 7 Polymérisation des filaments d'actine.

L'actine est présente dans la cellule sous deux formes : une forme glomérulaire (monomère) et une forme filamenteuse (polymère). Les microfilaments d'actine sont polarisés car ils possèdent une extrémité effilée (-) et une extrémité barbelée (+) et la fréquence d'incorporation de monomères d'actine, permettant l'élongation, est plus élevée au niveau de l'extrémité barbelée (+).

www.theses.ulaval.ca/2004/22083/ch01.html.

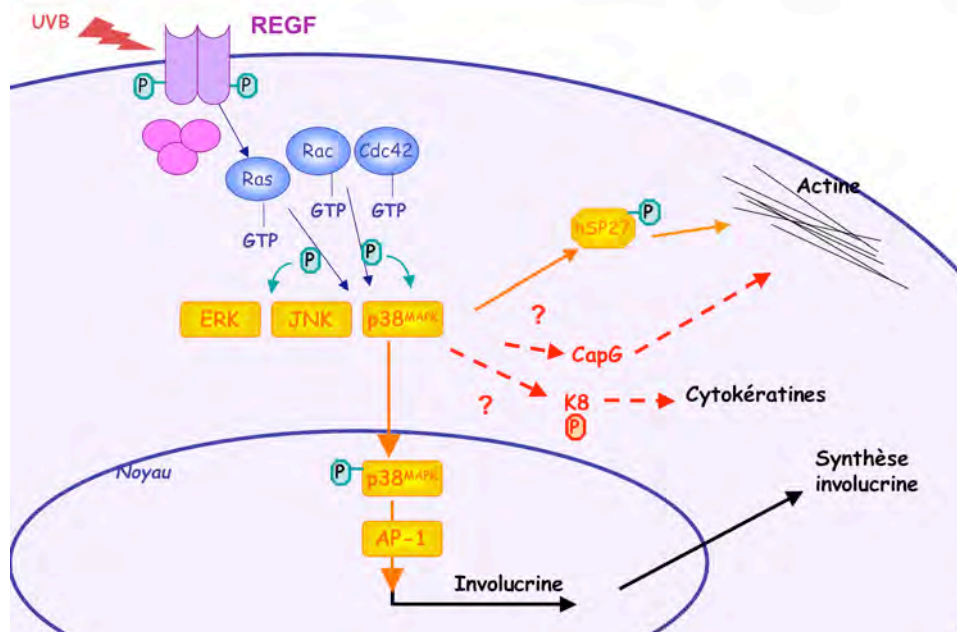


Figure 8 Modèle hypothétique des voies impliquées dans la réponse à long terme des kératinocytes N-htert après exposition aux UV-B

L'exposition au UV-B active le récepteur de l'EGF qui dimérise et s'autophosphoryle sur les résidus tyrosines grâce à son activité tyrosine kinase intrinsèque. Le récepteur activé déclenche ensuite une cascade de signalisation classique qui aboutit en aval à l'activation des MAPK par phosphorylation.

MATERIEL & METHODES

1 Conditions de culture des kératinocytes N-htert

1.1 Principe

Les cellules sont incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂ et en atmosphère humide (*Incubateur Heraeus Hera Cell 240 Qlab*). Il est important de réaliser la mise en culture de manière stérile, sous hotte à flux laminaire (*Esco class II Biohazard Safety Cabinet Aistream*), car différents organismes tels que les champignons et les bactéries peuvent contaminer la culture et ainsi modifier le comportement des cellules.

Les kératinocytes N-htert sont des kératinocytes humains immortalisés par expression ectopique de la télomérase. De plus, ces cellules n'expriment pas la protéine p16^{INK4a}. Néanmoins, elles conservent leur capacité de différenciation (Rheinwald and Green 1975).

1.2 Matériel et solutions

Voir tableau 1

1.3 Méthode d'ensemencement

Les cellules N-htert sont cultivées dans des boîtes de culture stériles de 75 cm² ou de 25 cm², dans du milieu sans sérum Epilife® (*Cascade*), auquel est ajouté un supplément de facteurs de croissance HKGS (5 ml pour une bouteille de 500 ml d'Epilife) et 250 µl de gentamycine (175 µg/ml), un antibiotique. Le milieu est changé tous les deux jours.

Les cellules sont repiquées lorsqu'elles arrivent à une densité cellulaire proche de la confluence mais sans l'atteindre, c'est-à-dire entre 2 et 4 jours après l'ensemencement. Elles sont alors rincées une fois avec 3 ml de trypsine EDTA qui sont éliminés. Pour détacher les cellules, une incubation de 5 à 10 min à température ambiante avec 2 ml de trypsine EDTA est nécessaire. La boîte est vigoureusement secouée et la trypsine est neutralisée à l'aide de 10 ml de milieu DMEM contenant 10 % de sérum de veau fœtal (FBS). Les cellules N-htert, ainsi mises en suspension, sont récoltées dans un tube stérile sur glace et centrifugés à 1 000 tours par min à 4°C pendant 5 min (*Centri Heraeus instruments fonction line labofuge 400R*). Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est resuspendu dans 8 ml d'Epilife, puis un comptage est effectué à l'aide d'une chambre de Neubauer. Ce comptage permet d'obtenir une estimation du nombre de cellules par ml de la suspension cellulaire et donc de calculer le volume nécessaire pour obtenir une concentration cellulaire précise et qui sera distribué dans 4 ou 10 ml par boîte de 25 cm² ou de 75 cm². Les boîtes sont délicatement mélangées afin d'assurer une répartition homogène des cellules, puis sont déposées dans l'incubation à 37°C.

1.4 Méthode de décongélation

Il faut préparer une boîte de culture de 75 cm² contenant 10 ml d'Epilife complet et un bécher contenant de l'eau à 37°C. Après avoir sorti l'ampoule congelée dans une cuve d'azote liquide, celle-ci est déposée directement dans l'eau à 37°C jusqu'à ce que la suspension de cellules soit décongelée. Le contenu de l'ampoule est alors récupéré de façon stérile et est transféré dans la boîte préalablement préparée. La boîte est ensuite déposée dans l'étuve et son contenu est légèrement mélangé afin de répartir les cellules de manière homogène.

Le milieu doit être impérativement changé le lendemain car le DMSO, présent dans la solution de congélation, est toxique pour les cellules et doit être éliminé.

1.5 Congélation des cellules

Il faut tout d'abord préparer le milieu 2 milieux de congélation. Le premier est composé de DMEM contenant 40 % de FBS et le second, de DMEM avec 20 % de DMSO. Après trypsinisation et centrifugation, les cellules sont resuspendues dans le DMEM 40 % de FBS. Environ 1 million de cellules de cette suspension sont mises dans un tube de cryocongélation. Ensuite, le même volume du milieu contenant le DMSO est ajouté au dernier moment. Les cellules sont donc congelées dans un milieu contenant au final 20 % de FBS et 10 % de DMSO. Les tubes de cryocongélation sont alors placés dans le récipient rempli d'alcool à -80°C pour au minimum une nuit. Après cette étape, les tubes sont déposés dans la cuve d'azote liquide.

2 Stimulation à l'EGF

2.1 Matériels et solutions

Voir tableau 2

2.2 Méthode

Les cellules N-htert sontensemencées la veille de la stimulation dans des boîtes de 75 cm^2 (200 000 cellules/boîte). Le lendemain, le milieu est remplacé soit par 8 ml d'Epilife seul pour la condition contrôle soit par 8 ml d'Epilife contenant de l'EGF à une concentration finale de 10 ng/ml (EGF 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ soit une dilution de 5 000x).

3 Stress répétés sub-létaux aux UVB

3.1 Principe

Les stress aux UVB effectués ne doivent pas causer la mortalité des cellules, ils sont donc sub-létaux. Des études ont déjà été réalisées à ce sujet mais après un stress unique aux UVB. Il est donc intéressant de voir ce qui se passe à long terme après plusieurs stress répétés sub-létaux, c'est ce qui est réalisé ici.

3.2 Matériel et solutions

Voir tableau 3

3.3 Méthode

L'ensemencement des cellules N-htert est réalisé deux jours avant le premier stress à raison de 2 000 cellules/ cm^2 . Après ces deux jours, les cellules vont être exposées aux UVB quatre fois par jour avec une exposition toutes les deux heures, et cela pendant deux jours. Ceci fait un total de huit expositions. Les cellules récupèrent ensuite pendant deux jours. Avant les stress, le milieu est décanté et les boîtes sont rincées une fois avec 10 ou 4 ml de PBS stérile pour les boîtes de 75 cm^2 et 25 cm^2 respectivement.

Pour les expositions aux UVB, 10 ou 4 ml de PBS stérile, selon le type de boîte, sont déposés et bien répartis sur l'ensemble de la surface des boîtes. Les cellules sont exposées à une dose d'UVB de $300\text{ mJ}/\text{cm}^2$.

Seulement deux boîtes peuvent être traitées à la fois et sont installées de part et d'autre d'une boîte témoin contenant un capteur. Celui-ci est relié à un radiomètre qui permet de mesurer la dose d'UVB que les cellules reçoivent. Les cellules « contrôles » sont traitées de la même façon (rinçage au PBS) mais ne sont pas exposées aux UVB dans le caisson.

Lorsque la dose d'UVB atteint 300 mJ/cm², le PBS est éliminé puis remplacé par 10 ml d'Epilife complet. Les cellules sont incubées pendant deux heures dans l'incubateur à 37°C en présence de 5% de CO₂.

Après le dernier stress, il faut remettre 12 ml d'Epilife dans les boîtes pour les deux jours de récupération et replacer les boîtes dans l'incubateur à 37°C.

4 Les extractions protéiques

4.1 Principe

L'extraction protéique est réalisée grâce à un tampon de lyse, qui va casser les cellules et libérer leur contenu. Voici la description des différentes techniques d'extraction protéique utilisées dans ce travail.

4.2 Matériel et solutions

Voir tableau 4

4.3 Méthode 1 : Extraction avec le tampon " Biosource "

Les boîtes sont déposées sur de la glace pour empêcher l'activité des protéases et d'autres enzymes. Premièrement, il faut rincer les boîtes avec 10 ml de PBS froid (stocké à 4°C), bien aspirer celui-ci, ensuite déposer 240 µl de tampon de lyse dans la boîte de 75 cm² et en racler le fond à l'aide d'un râteau stérile afin de récupérer les cellules. Lorsque le tapis cellulaire semble désintégré, la solution est récupérée dans un microtube à 4°C. Quelques passages de la solution protéique à travers une seringue permettent d'améliorer l'extraction des protéines par le tampon de lyse. Une étape de centrifugation à 13 000 tours par min, à 4°C pendant 15 minutes est alors réalisée et le surnageant est récupéré puis congelé à - 20°C.

4.4 Méthode 2 : Extraction avec la trypsine

Les cellules,ensemencées dans des boîtes T75, sont rincées avec 3 ml de trypsine-EDTA puis 2 ml de trypsine-EDTA sont déposés. Une incubation de 5 à 10 min à température ambiante est ensuite nécessaire pour détacher les cellules. Lorsque les cellules sont détachées, la trypsine est neutralisée par 10 ml de milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (FBS).

Les cellules N-htert, ainsi mises en suspension, sont récoltées dans un tube stérile sur glace et centrifugées à 1 000 tours par min et à 4°C pendant 5 min.

Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 20 ml de PBS froid. Une centrifugation à 1 000 tours par min, à 4°C et pendant 5 min est alors effectuée. Le surnageant est à nouveau éliminé et le culot resuspendu dans 1 ml de PBS froid puis transféré dans un microtube. Une dernière centrifugation de 1000 tours par min, à 4°C pendant 5 min est réalisée. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 70 µl de tampon de lyse Biosource, suivi d'une centrifugation à 13 000 tours par min, à 4°C pendant 20 min. Le surnageant est ensuite récupéré dans un nouveau microtube puis congelé à - 20°C.

4.5 Méthode 3 : Extraction avec le tampon "DLA"

Le protocole d'extraction avec le tampon DLA est très semblable à celui utilisant le tampon "Biosource". Seules deux étapes supplémentaires sont réalisées avant la centrifugation : une étape de sonication de 5 min et une étape d'agitation de 30 min à 4°C. Une centrifugation à 13 000 tours par min, à 4°C pendant 15 min est alors réalisée et le surnageant est récupéré puis congelé à – 20°C.

5 Le dosage protéique par la méthode du Bradford

5.1 Principe

Il est nécessaire de doser les quantités de protéines contenues dans chaque échantillon afin d'évaluer leur concentration protéique pour pouvoir prélever une quantité égale dans chaque échantillon.

5.2 Matériel et solutions

Voir tableau 5

5.3 Méthode

1 ml de réactif Bradford, dilué 5 fois et filtré, est déposé dans un tube. 2,5 µl d'échantillon sont ajoutés dans le tube. La réaction colorimétrique est optimale après 5 min et donc, la mesure de l'absorbance est réalisée 5 minutes après avoir ajouté l'échantillon au réactif Bradford. La lecture de l'absorbance est réalisée à 595 nm par un spectrophotomètre. Pour ce faire, le contenu du tube est transvasé dans une cuvette de spectrométrie. Après la lecture, la cuvette est rincée une fois avec de l'acétone et deux fois avec de l'eau distillée entre chaque mesure d'échantillon.

2,5 µl de BSA (Bovine Serum Albumine 2 mg/ ml) sont utilisés comme étalon. Le blanc échantillon (1 à 5 µl) correspond au tampon de lyse tandis que le blanc standard est de l'eau puisque la solution de BSA est diluée dans l'eau. Pour chaque échantillon, deux réplicats sont prévus afin de pouvoir en réaliser la moyenne.

On calcule les concentrations en protéine de l'échantillon de la manière suivante :

$$\frac{((\text{Moyenne Test} - \text{Moyenne Blanc}) / (\text{Moyenne Etalon} - \text{Moyenne Blanc Etalon})) \times (\text{Cc Etalon} \times \mu\text{l étalon})}{\text{volume des échantillons}} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

6 Le Western blot

6.1 Principe

Des extraits protéiques sont chargés sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Le sodium Dodecyl Sulfate est un détergent qui dénature les protéines et leur confère une charge négative. Sous l'influence d'un courant électrique passant dans la cuve d'électrophorèse, les protéines migrent dans le gel vers l'anode et cette migration permet la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire.

Un marqueur de poids moléculaire, composé de différentes protéines de poids moléculaires connus est placé dans un puit et permet de repérer la protéine recherchée. Lorsque la migration est terminée, les protéines piégées dans le gel sont transférées sur une membrane de ployvinylidène difluoride (PVDF), cette étape est nommée le transfert. Cette membrane est ensuite saturée avec une solution contenant du lait afin de minimiser la fixation aspécifique des anticorps. Le traitement de la membrane constitue l'étape suivante et permet de détecter la protéine d'intérêt à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre l'un de ses épitopes (anticorps primaire). Un deuxième type d'anticorps (anticorps secondaire), couplé à la peroxydase, va reconnaître le fragment Fc des anticorps primaires. La révélation se fait grâce à la peroxydase, qui produit de la lumière après son oxydation. On détecte ensuite cette production de lumière.

6.2 Matériel et solution

Voir tableau 6

6.3 Méthode

6.3.1 L'électrophorèse

Préparation du gel de migration

Pour un gel à 10%, préparer dans un berlin avec agitateur magnétique le mélange suivant : 16,66 ml de Acrylamide 30%, 12,5 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 18,35 ml d'eau et 25 µl de Temed. A cela, il faut ajouter au dernier moment 2,5 ml de persulfate d'ammonium 1% et agiter quelques secondes avant de couler la solution entre les deux plaques en verre du montage.

La polymérisation se fait pendant une heure en recouvrant le gel par une couche d'isobutanol saturé en eau afin d'obtenir une surface plane et d'éviter le contact avec l'oxygène.

Préparation du gel de concentration

Le gel de concentration permet de concentrer les échantillons au fond des puits.

Pour un gel de 10%, préparer dans un berlin avec agitateur magnétique : 1 ml de acrylamide 30%, 2,5 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 5,5 ml d'eau et 10 µl de Temed. Il faut ajouter ensuite, au dernier moment, le persulfate d'ammonium 1% et agiter quelques secondes. Le gel de concentration est alors coulé au-dessus du gel de migration, préalablement débarrassé de la couche d'isobutanol et rincé une fois avec de l'eau. Dès que le gel de concentration est coulé, un peigne y est placé et la polymérisation dure au moins une heure.

Préparation et dépôt des échantillons

Le dosage protéique par la méthode du Bradford, décrite précédemment fournit une estimation de la concentration en protéines dans chaque échantillon, ce qui permet de calculer les volumes nécessaires pour obtenir 30 µg de protéines par piste de gel. Les échantillons sont tout d'abord décongelés à 4°C, fortement agités et ensuite centrifugés. Du tampon de charge dilué 5 fois, est ajouté dans chaque échantillon. Cette étape est réalisée sous hotte car ce tampon contient du β-mercaptoéthanol. Les échantillons sont ensuite chauffés à 100°C pendant 4 minutes, centrifugés à 13 000 tours par min pendant 10 min puis déposés dans les puits du gel de concentration. De plus, 10 µl du marqueur de poids moléculaire coloré sont chargés dans un autre puit.

L'électrophorèse

Le tampon d'électrophorèse contient 25 mM de Tris-HCl, 0,192 M de glycine et 0,1% de SDS. La migration du gel 10% se fait à 30 mA pendant les 30 premières min et ensuite à 40 mA pendant environ 2h30.

6.3.2 Transfert des protéines sur membrane (semi-dry blotting)

Préparation de la membrane pour le transfert

La membrane est découpée à la dimension du gel, et est incubée pendant 1 min dans du méthanol puis dans le tampon de transfert, pendant 10 min minimum.

Le transfert proprement dit

Il faut découper quatre morceaux de papier Whatmann ajustés aux dimensions de la membrane.

Le montage du système de transfert s'effectue de la façon suivante : deux éponges sont déposées sur l'anode, deux morceaux de papier Whatmann sont déposés au-dessus, ensuite la membrane puis le gel. Le gel est enfin recouvert de deux morceaux de papier Whatmann, eux même recouverts de deux éponges. Chaque couche est imbibée de tampon de transfert. Il est important de réaliser le montage en évitant les bulles. Le système est alors fermé et le transfert s'effectue pendant deux heures à 150 mA, 5-6 V ou toute la nuit à 30 mA, 5-6 V.

6.3.3 Traitement de la membrane et détection de chémoluminescence.

Saturation de la membrane

La membrane est immergée dans de l'agent bloquant (Amersham) dilué dans du TBS-Tween 1x (dilution 2%) pendant deux heures à température ambiante ou pendant une nuit à 4°C. Cette étape de saturation permet de bloquer les sites de fixation non spécifiques.

Traitement de la membrane : anticorps primaires et secondaires

La membrane est incubée en présence d'un anticorps spécifique dilué, en fonction de son affinité et de la quantité de protéines chargées, dans de l'agent bloquant (Amersham 2 % dilué dans du TBS-Tween 1x) pendant deux heures à température ambiante ou toute la nuit à 4°C et sous agitation. La dilution de l'anticorps primaire varie entre 500 fois et 50 000 fois.

La membrane est ensuite lavée trois fois pendant 15 min dans du TBS-Tween 1x et est incubée, pendant 45 à 60 min à température ambiante, en présence d'un anticorps secondaire dilué également dans de l'agent bloquant, capable de reconnaître l'anticorps primaire et couplé à une peroxydase. La dilution de l'anticorps secondaire varie entre 100 000 fois à 200 000 fois selon l'anticorps.

Trois rinçages de 15 minutes avec du TBS-Tween sont nécessaires pour éliminer l'excédent d'anticorps secondaires avant la révélation.

La révélation

Les réactifs ECL (Enhancing Chemo Luminescence) (Amersham), la solution A et la solution B, sont mélangés dans un rapport 1 : 1 juste avant l'utilisation. Le mélange est déposé sur la membrane pendant 5 minutes. La membrane est alors égouttée puis placée entre deux feuilles de papier transparent dans une cassette (Amersham). Dans le noir, un film radiographique est déposé sur le transparent. La durée d'exposition du film est variable pour chaque expérience en fonction de l'intensité du signal.

Le film est ensuite immergé dans le révélateur jusqu'à l'apparition des bandes attendues, puis effectue un léger passage dans l'eau pour enfin être fixé dans le fixateur pendant au moins 3 minutes. Les films sont finalement rincés à l'eau de ville.

Recyclage des membranes pour une utilisation ultérieure

La membrane est incubée dans une solution de recyclage pendant environ 15 minutes à 37°C. Elle est ensuite lavée deux fois 10 minutes à température ambiante avec du TBS-Tween 1x puis à nouveau bloquée avec un agent bloquant (Amersham 2 % TBS-Tween 1x) pendant deux heures à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.

Pour vérifier l'efficacité du recyclage de la membrane, il faut, après l'étape de saturation, effectuer trois fois 15 min de rinçage avec du TBS-Tween 1x, incuber la membrane en présence d'un anticorps secondaire pendant 45 à 60 min à température ambiante, effectuer trois fois 15 min de rinçage et ensuite révéler avec l'ECL.

7 L'extraction d'ARN

7.1 Principe

L'extraction de l'ARN demande l'application de certaines précautions telles que d'être réalisée en absence de ribonucléases. En effet, l'ARN est sensible aux ribonucléases présentes dans notre environnement habituel et sur notre peau en particulier. Les opérations sont effectuées avec des gants. Le plan de travail, ainsi que tous les objets utilisés (portoir, pipettes, ...) sont nettoyés avec du SDS 0,1 % (Sodium Dodécyl Sulfate).

7.2 Matériel et solutions

Voir tableau 7

7.3 Méthode

Tout d'abord, environ 15 min avant l'utilisation, il faut porter la solution de phenol/chloroform/isoamyl à température ambiante et refroidir la solution dénaturante sur glace. Quatre étapes composent l'extraction de l'ARN : l'extraction proprement dite, la précipitation, le lavage et enfin, la resuspension de l'ARN total.

7.3.1 L'extraction de l'ARN total

Après un rinçage avec 5 ou 10 ml de PBS à 4°C et une décantation optimale, 300 µl ou 500 µl d'agent dénaturant, selon le format de la boîte de culture (Boîtes de 25 ou 75 cm²), sont ajoutés. Le fond de la boîte est ensuite raclé à l'aide d'un râteau stérile et le lysat est récupéré dans un microtube. 30 µl ou 50 µl d'acétate de sodium 2 M sont alors ajoutés et les tubes sont mélangés par 4 ou 5 inversions. Nous ajoutons alors 300 ou 500 µl de phénol/chloroform/isoamyl aleshol, prélevés dans la phase organique, dans le microtube qui sera mélangé par 4 ou 5 inversions.

Les microtubes sont alors agités fortement pendant 10 secondes jusqu'à homogénéisation c'est-à-dire jusqu'à la formation d'un composé blanchâtre. Après une incubation de 15 min sur glace, le microtube est centrifugé à 12 000 tours par min, à 4°C pendant 20 min. En ajoutant du chloroforme, on réalise l'extraction de l'ARN car la différence de solubilité des constituants cellulaires permet leur séparation entre 3 phases non miscibles après centrifugation.

7.3.2 Précipitation de l'ARN total

La phase supérieure, c'est-à-dire la phase aqueuse contenant l'ARN total, est récupérée délicatement sans toucher l'interface blanche, contenant les protéines. La phase inférieure constitue la phase organique et contient les acides nucléiques et les molécules lipidiques. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau microtube. Un volume égal d'isopropanol est ajouté et le contenu est mélangé par quelques inversions. Le microtube est ensuite incubé à -20°C pendant minimum 30 min ou toute la nuit. Lorsque l'incubation est terminée, une étape de centrifugation à 12 000 tours par min, à 4°C et pendant 20 min est réalisée et le surnageant est éliminé.

7.3.3 Lavage et resuspension de l'ARN total

Le culot est resuspendu dans 1 ml d'éthanol 75 % à 4°C et la suspension est de nouveau centrifugée à 12 000 RPM, à 4°C pendant 15 minutes. Il faut éliminer le surnageant et laisser le culot sécher à l'air pendant environ 15 minutes. L'ARN total est resuspendu dans de l'eau sans ribonuclease.

L'ARN est ensuite dosé dans une cuvette de spectrophotomètre mesurant l'absorbance à 260 et 280 nm à partir d'une dilution de 50 fois.

8 La transcription inverse

8.1 Principe

La transcription inverse consiste à générer des brins d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'une matrice d'ARN messagers (ARNm). Des amorces de polyT s'hybrident sur les queues polyA des ARNm, permettant la synthèse d'un brin d'ADNc par ARNm grâce à une transcriptase inverse.

8.2 Matériel et solutions

Voir tableau 8

8.3 Méthode

Grâce au dosage de l'ARN, nous prélevons un volume précis correspondant à 2 µg d'ARN total. Nous le plaçons dans un microtube et ajoutons de l'eau pour arriver à un volume final de 7,5 µl. 2 µl d'oligonucléotides dT, dont la concentration est de 500 ng/µl, sont ajoutés dans ce microtube, agiter fortement, centrifuger un court instant et incubé à 70°C pendant 10 min. Le microtube Eppendorf est ensuite placé sur la glace pendant 5 min.

Pendant les temps d'incubation, le mélange suivant est réalisé : 4 µl de Buffer RT 5X, 2 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de RNAsin (40U/µl), 1 µl de dNTP mix, 1 µl d'eau RNase-free.

Ensuite, 9 µl de ce mélange sont alors ajoutés dans l'échantillon, qui est ensuite incubé pendant 5 min à température ambiante.

Finalement, 1,5 µl d'enzyme SuperScript (200U/µl) sont déposés dans chaque microtube Eppendorf et une incubation de 1h30 à 42°C est réalisée. Afin de neutraliser la réaction, le tube est placé à 70°C pendant 15 min. Ensuite, 1 µl de RNaseH (2U/µl) est ajouté et l'échantillon est incubé 20 minutes à 37°C. L'ADN complémentaire obtenu est conservé à -20°C.

9 La PCR en temps réel

9.1 Principe

La PCR ou réaction de polymérisation en chaîne en temps réel se base sur la technique classique de la PCR (Polymerisation Chain Reaction) et permet de mesurer l'amplification de l'ADN cycle par cycle. Il est possible de visualiser cette amplification est possible grâce à l'utilisation d'un fluorochrome, comme le SYBR Green. Ce fluorochrome, qui émet de la fluorescence à 520 nm, possède la propriété de s'intercaler dans le petit sillon de l'ADN double brin. La fluorescence émise par la sonde intercalée dans l'ADN est donc proportionnelle à la quantité d'ADN de départ.

Le cycle seuil (ou cycle threshold) peut être défini comme le cycle de PCR au cours duquel la fluorescence émise peut se distinguer du bruit de fond et correspond à la phase exponentielle de l'amplification. Le cycle seuil est inversement proportionnel à la quantité de matériel de départ, c'est-à-dire que plus la quantité d'ADN de départ est élevée, plus le cycle seuil sera faible.

Une étape de dissociation a lieu à la suite de l'étape d'amplification afin de s'assurer de la spécificité de celle-ci. Cette étape consiste à une augmentation progressive de la température jusque 95°C, qui va entraîner la dissociation des amplicons et une forte diminution de la fluorescence.

9.2 Matériel et solutions

Voir tableau 9

9.3 Méthode

L'ADN complémentaire, obtenu grâce à la transcription inverse est utilisé à une dilution de 100 fois et les amorces à une concentration de 3 μM . Pour une réaction, le mélange suivant est préparé dans un microtube : 2,5 μl d'eau distillée, 2,5 μl d'amorce sens (3 μM), 2,5 μl d'amorce antisens (3 μM) et 12,5 μl de SYBR Green PCR Master Mix.

Dans une plaque de 96 puits, 20 μl du mélange sont distribués par puits, et ensuite 5 μl d'ADN complémentaire dilué 100 fois ou 5 μl d'eau distillée (blanc) sont ajoutés. La plaque est recouverte avec un autocollant adéquat puis centrifugée à 600 tours par min pendant 5 min.

Lorsque la centrifugation est terminée, la plaque est placée dans le 7900HT Fast Real-Time PCR system, les paramètres étudiés ainsi que la répartition des échantillons dans la plaque sont encodés. Le programme de cycles de PCR utilisé est le suivant : 2 minutes à 50°C, 10 minutes à 95°C et 40 fois un cycle de 15 secondes à 95°C suivi de 1 minutes à 60°C. Pour la courbe de dissociation : 15 secondes à 95°C et 15 minutes à 60°C.

10 Détection de protéines spécifiques par immunofluorescences

10.1 Principe

La détection de protéines spécifiques par immunofluorescence est une technique qui permet de visualiser la répartition d'une protéine d'intérêt dans la cellule en utilisant un anticorps spécifique de cette protéine et un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome qui reconnaît l'anticorps primaire. Il suffit d'exciter avec une longueur d'onde précise le fluorochrome lié à l'anticorps secondaire pour localiser la protéine cible au sein de la cellule. Généralement, lorsqu'une immunofluorescence est réalisée, une étape de coloration du noyau avec un agent intercalant (To-PRO 3) est effectuée afin de localiser les cellules.

10.2 Matériel et solutions

Voir tableau 10

10.3 Méthode

Les cellules d'intérêt sont repiquées etensemencées à une densité de 20 000 cellules par puits sur des couvre-objets déposés préalablement au fond des puits d'une plaque de 24 puits.

Premièrement, les couvre-objets portant les cellules sont rincés dans le puit avec du PBS préchauffé à 37°C. Les puits sont ensuite décantés et les cellules sont fixées 10 min avec 1 ml de PBS-PFA 3 % à température ambiante. Après trois rinçages au PBS, les cellules sont perméabilisées avec 1 ml de PBS-Triton 1 % pendant 5 minutes. Les puits sont alors rincés trois fois pendant 10 minutes avec du PBS-BSA 3 %.

Pendant ce temps, une chambre humide est réalisée en tapissant le fond d'une boîte de pétri de papier Whatman mouillé d'eau distillée et recouvert de parafilm. Une goutte de 30 µl d'anticorps dilué 150 fois dans du PBS-BSA 3 % est déposée sur le parafilm. Chaque couvre-objet est alors récupéré du fond des puits à l'aide d'une pince, égoutté légèrement et retourné sur la goutte d'anticorps primaire. La durée de l'incubation de l'anticorps primaire est de deux heures à température ambiante.

Lorsque cette incubation est terminée, les couvre-objets sont replacés dans leur plaque de 24 puits (veiller à les retourner du bon côté pour que les cellules se retrouvent sur leur face) et sont rincés trois fois avec du PBS-BSA 3 %. L'incubation avec l'anticorps secondaire est réalisée de la même façon que celle de l'anticorps primaire, les couvre-objets sont mis en présence de l'anticorps secondaire dilué 500 fois dans du PBS-BSA 3 % dans une chambre humide et sont incubés pendant une heure à température ambiante et dans l'obscurité afin de préserver les fluorochromes.

Il faut alors replacer tous les couvre-objets dans les puits toujours en veillant à les retourner. Trois rinçages au PBS-BSA 3 % et un dernier au PBS seul sont effectués avant de marquer les noyaux avec un agent intercalant dans l'ADN (To-PRO 3). Ce marquage est aussi réalisé de la même façon, c'est-à-dire en chambre humide, et l'incubation dure 30 minutes et se fait dans l'obscurité en présence de To-PRO 3 dilué 80x dans une solution de RNase (2mg/ml PBS). Une fois ce dernier marquage terminé, les couvre-objets, remis dans les puits, sont rincés trois fois au PBS puis sont montés sur lames à l'aide de Mowiol. Les lames sont alors conservées à 4°C pendant au moins une nuit avant d'être observées au microscope confocal à fluorescence.

II. MATERIEL & METHODES

Une autre technique de fixation et perméabilisation a été utilisée pour la réalisation de l'immunofluorescence des kératines phosphorylées ; celle-ci emploie l'acétone. Les couvre-objets sont également rincés une fois avec du PBS préchauffé à 37°C mais sont ensuite disposés dans une boîte en verre contenant de l'acétone. Une incubation de 5 minutes à – 20°C est alors réalisée. Cette technique permet de fixer et de perméabiliser les cellules en une seule étape. Les étapes suivantes sont les mêmes que celles décrites ci-dessus.

Tableau 1 Matériel et solutions utilisés pour la culture de kératinocytes N-htert

Matériel et solutions	Composition	Références
Epilife [CaCl ₂ 0,06 mM]	Milieu sans sérum	Cascade M-EPI-500-CA Cascade Biologics, USA
Human Keratinocytes Growth Serum ou HKGS	BPE 0,2% v/v ; EGF 0,2 ng/ml ; hydrocortisone 0,18 µg/ml ; bovine-insuline 5 µg/ml ; bovine-transferrine 5 µg/ml	Cascade S-001-5 Cascade Biologics, USA
Trypsine-EDTA (éthylènediaminetétraacétique acide)		Invitrogen 25300-054 Invitrogen Corporation USA
Gentamycine	Solution stock : 10 µg/ ml Solution finale : 175 µg/ ml	Invitrogen 15750-037 USA Invitrogen Corporation USA
DMEM-10%FBS+P/S (Fetal bovine serum)	Milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium enrichi d'antibiotiques et de sérum : - Streptomycine sulfate : 100 ug/ml - Pénicilline : 100 U/ml - 10% de sérum de veau fœtal (FBS)	Milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium Streptomycine sulfate : Sigma, USA Pénicilline : Sigma, USA Sérum de veau foetal : Gibco-BRL, UK
Boîtes de culture stériles de 75 cm ² (T75) et de 25 cm ² (T25)		Corning, USA

Tableau 2 Matériel et solutions utilisés pour la stimulation à l'EGF

Produits	Références
EGF stock 50 µg/ ml (aliquots de 2 µl)	Invitrogen Corporation USA

Tableau 3 Matériel et solutions utilisés pour la réalisation des stress répétés subcytotoxiques aux UVB

Matériel et solution	Composition	Références
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Tampon phosphate salin (10mM, NaCl 0,9%, pH 7,4) porter à volume avec de l'eau distillée	NaCl : Merck, Germany
Epilife + HKGS + Gentamycine		Epilife : Cascade M-EPI-500-CA Cascade Biologics, USA HKGS : CA Cascade S-001-5 Cascade Biologics, USA Gentamycine : Invitrogen 15750-037 Invitrogen Corporation, USA
Lampe UVB		(TL20W/01) Philips, The Netherland
Radiomètre et capteur UVB		Bioblock Scientific, Belgium

Tableau 4 Matériel et solutions utilisés pour les extractions protéiques

Matériel et solutions	Compositions	Références
Tampon de lyse Biosource + DTT 2 mM + PIC (40 µl/ml de tampon) + PIB (40 µl/ml de tampon)	Tris pH 7,4 10 mM NaCl 100 mM Glycerol 10 % NP 40 1 % SDS 0,1 % DOC (deoxycolate) 0,5 %	Glycerol : Pierce, USA PIC : Complete, Germany PIB : Complete, Germany NaCl : Merck, Germany NP 40 : Merck, Germany SDS : Applied Biosystems, USA DOC : Pierce, USA DTT : Applied Biosystems, USA
Tampon de lyse DLA pH 8,5 DIGE-Labelling-Buffer DLA	Urée 7 M Thiourée 2M Chaps 2 % DTT 2 %	Invitrogen Corporation USA
Trypsine-EDTA (éthylènediaminetétraacétique acide)		Invitrogen 25300-054 Invitrogen Corporation USA
PBS (phosphate buffer saline)	Tampon phosphate salin (10mM, NaCl 0,9%, pH 7,4) Porter à volume avec de l'eau distillée	NaCl : Merck, Germany
Râteau stérile		TRP, switzerland

Tableau 5 Matériel et solutions utilisés pour le dosage protéique par la méthode de Bradford

Matériel et solutions	Références
Solution de Bradford	Bio-Rad Protein : Assay Biorad, Germany
Étalon BSA	BSA (Bovine Sérum Albumin) (2 µg/µl) Merck, Germany
Spectrophotomètre	Ultrospec 2100 pro, USA

Tableau 6 Matériel et solutions utilisés pour la réalisation des Western blots

Matériel et solutions	Compositions	Références
<u>Gels à couler Tris-Glycine</u>		
Gel de migration	Tris-HCL 1,5M pH 8,8; SDS 0,4%, acrylamide 30%; bisacr 0,8%, H ₂ O, Temed, APS (Amonium persulfate 1%- 50 mg/5 ml H ₂ O)	Merck, Germany Temed et APS : Plus One Pharmacia Biotech
Gel de concentration	Tris-HCL 0,5M pH 6,8 ; SDS 0,4%, acrylamide 30%; bisacr 0,8%, H ₂ O, Temed, APS (Amonium persulfate 1%- 50 mg/5 ml H ₂ O)	Merck, Germany Temed et APS : Plus One Pharmacia Biotech
Tampon d'électrophorèse (pH 8,3-8,4) 1l	Tris-HCL 25 mM, glycine 0,192 M et SDS 0,1 %	Merck, Germany
Marqueur de poids moléculaire		See blue Invitrogen Invitrogen Corporation, USA
<u>Transfert</u>		
Membrane polyvinylidène difluoride (PVDF)		Amersham, USA
<u>Traitement de la membrane</u>		
Tampon de rinçage TBS 1x Tween 0,1 %	<p>TBS 10 x à diluer pour 1l : 24,22 gr de Tris (P1) 80,06 gr de NaCl (P1) 800 ml d'eau Porter à pH 7,4 Porter à 1l avec de l'eau</p> <p>TBS 1 x Tween 0,1 % pour 1l : 100 ml de TBS 10 x 1 ml de Tween 20 Porter à 1l avec de l'eau</p>	<p>Merck, Germany</p> <p>Tween 20 : Sigma, Germany</p>
Agent bloquant		Amersham, UK
Substrat de révélation		ECL (Enhanced Chemo Luminescence) Amersham, UK
Film autoradiographique		Amersham, UK
Logiciels		Image master laboscan V2003.01 Image quant V2003.03

Liste des anticorps primaires

Protéines ciblées (poids moléculaires)	Poids moléculaires (kDa)	Dilution de l'anticorps primaire	Type	Dilution de l'anticorps secondaires	Références
α -tubuline humaine	55	1/50 000	souris	1/200 000	# sc 5586 Santa Cruz, Germany
Cap G	40	1/5000	lapin	1/150 000	Pr Silacci (Lausanne, Suisse)
Anti-EGF receptor (neutralizing) clone LA1	180	1/5000	souris	1/150 000	Upstate cat # 05-101 Lot 27953
Anti-EGF receptor pY1173 phosphospecific antibody, unconjugated	185	1/5000	lapin	1/150 000	Biosource 44- 797G PAb Anti
Phospho-EGF- receptor Tyr 1173 (53A5) RmAb	170	1/5000	lapin	1/150 000	Cell signaling # 4407
ERK-total 1,2	42-44	1/5000	lapin	1/150 000	Upstate Anti MAPK cat # 06-182
Phospho-p42/44 MAPK (thr202/tyr204) (E10)	42-44	1/5000	souris	1/150 000	Cell signaling E10 #9106S
Hsp27 (C-20)	27	1/10 000	chèvre	1/150 000	Santa Cruz biotechnology sc-1048, USA
Anti-phospho-Hsp27 (Serine 82)	27	1/50 000	lapin	1/200 000	Upstate 07-489
SAPK/JNK Antibody	46-54	1/1000	lapin	1/100 000	Cell signaling #9252
JNK1 (C-17)	46	1/5000	lapin	1/100 000	Santa Cruz biotechnology sc-474, USA
p-JNK (G7) (thr 183 et tyr 185)	46-54	1/2000	souris	1/150 000	Santa Cruz biotechnology sc-6254, USA
Anti-JNK 1&2 pTpY183/185 Phosphospecific Antibody, Unconjugated	49-55- 54	1/2000	lapin	1/150 000	Biosource 44- 682G PAb pTpY183/185 lot 0202
Keratin 6	60	1/5000	souris	1/100 000	NeoMarkers Ab-1 (LHK6B) Fremont, CA

Cytokeratin 8	52,5	1/5000	souris	1/100 000	Tebu-bio Novocastra NCL-L-CK8- TS1, UK
Keratin 8 (phospho-specific sérine73)	52,5	1/1000	souris	1/100 000	NeoMarkers K8 Ab-7 (LJ4) Fremont, CA
Keratin 8 (phospho- specific sérine 431	52,5	1/1000	souris	1/100 000	NeoMarkers K8 Ab-5 (5B3) Fremont, CA
P21 (F-5)	21	1/5000	souris	1/200 000	Santa Cruz biotechnology p21 (F-5) sc- 6246, USA
p38-total MAPK Antibody	43	1/2000	lapin	1/150 000	Cell signaling #9212 Technology™
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Antibody	43	1/1000	lapin	1/150 000	Cell signaling #9211S

Liste des anticorps secondaires

IgG	Références
Anti-souris	Amersham Pharmacia Biotechnology, Buckinghamshire
Anti-lapin	Amersham Pharmacia Biotechnology, Buckinghamshire
Anti-chèvre	Dako, A/S, Danemark

Tableau 7 Matériel et solutions utilisés pour les extractions d'ARN

Matériel et solutions	Références
Kit extraction ARNm RNAgents : <ul style="list-style-type: none"> • RNAgents Dénaturing Solution • Acétate de sodium 2M pH 4,0 • Phénol:Choloroforme:Isoamyl Alcohol (99:24:1, pH4,7) • Isopropanol • Eau RNase-free 	Promega, USA
Ethanol 75% RNase-free	Merck, Germany
PBS (phosphate buffer saline) Tampon phosphate salin (10mM, NaCl 0,9%, pH 7,4) Porter à volume avec de l'eau distillée	NaCl : Merck, Germany

Tableau 8 Matériel et solutions utilisés pour la réalisation de la transcription inverse

Matériel et solutions	Références
RNasin Ribonuclease Inhibitor	(#N2511) Promega, USA
Ribonuclease H	(#18021-014) Gibco BRL
Nuclease-free water	(#P119C) Promega, USA
Oligo(dT)(12-18) Primer	(#18418-012) Gibco BRL Invitrogen Corporation, USA
dNTP set	Eurogentec, Belgium
Superscript II reverse transcriptase	Invitrogen Corporation, USA
DTT 0,1M	Invitrogen Corporation, USA
Buffer 5X	Invitrogen Corporation, USA

Tableau 9 Matériel et solutions utilisés pour la real-time PCR

Matériel et solutions	Composition	Références
SYBR Green PCR Master Mix		Applied Biosystems, USA
Amorces sens et Antisens p21, MMP-9 Involucrine GAPDH	CTG GAG ACT CTC AGG GTC GAA et CCA GGA CTG CAG GCT TCC T CCT TCC TTA TCG CCG ACA AGT et ACC GAC GCG CCT GTG TAC GTGGCCACCCAAACATAAATAAC et CCTAGCGGACCCGAAATAAGT ACC CAC TCC TCC ACC TTT GAC et GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA	
Plaque 96 puits		Applied Biosystems, USA
SDS 2.2.1		Applied Biosystems, USA

Tableau 10 Matériel et solutions utilisés pour l'immunofluorescence

Matériel et solutions	Composition	Références
Plaques 24 puits		Costar, Corning, USA
Lamelles couvre-objet de 13 mm de diamètre		Vel, Germany
Lames porte-objet de 2,6x7,6 cm		Vel, Germany
PBS	- 20 ml de tampon phosphate 0,5 M pH 7,4 - 9 g de NaCl - porter à 1l avec eau distillée	NaCl : Merck, Germany
PBS-BSA 3 %	- 100 ml de PBS - 3 g de BSA	BSA : Sigma, USA
PBS-Triton X-100 1 %	- 20 ml de PBS - 0,2 g de Triton X-100	Triton X-100 : Merck, Germany
PBS-PFA 3 % (paraformaldéhyde)	- 3 g de PFA dissous dans PBS - porter à 100 ml avec PBS	PFA : Merck, Germany
To-PRO 3 dilué 80x dans RNase A (2mg/ml)	- 5 µl de To-PRO 3 - 395 µl de RNase A (2mg/ml)	To-PRO 3 : Molecular Probes, USA RNase A : Molecular Probes, USA
Mowiol		Sigma-Aldrich, Germany-UK

Liste des anticorps primaires

Protéine ciblée	dilutions	Types	Références
Cap G	1/150	Lapin	Pr Silacci (Lausanne) Suisse
Phospho-Hsp27	1/150	Lapin	Upstate 07-489
Hsp27-total	1/150	Chèvre	Santa Cruz biotechnology hsp27 (C20) sc-1048
Keratin 6	1/150	Souris	NeoMarkers Ab-1 (LHK6B)
Cytokeratin 8	1/150	Souris	Tebu-bio Novocastra NCL-L-CK8-TS1, UK
Keratin 8	1/150	Souris	NeoMarkers K8 Ab-7

(phospho-specific sérine73)			(LJ4) Fremont, CA
Keratin 8 (phospho-specific sérine 431)	1/150	Souris	NeoMarkers K8 Ab-5 (5B3) Fremont, CA

Liste des anticorps secondaires

Immunoglobuline ciblée	dilutions	Références
Anti-souris couplé à un fluorochrome alexa 488 nm	1/500	Molecular Probes
Anti-lapin couplé à un fluorochrome alexa 488 nm	1/500	Molecular Probes
Anti-chèvre couplé à un fluorochrome alexa 488 nm	1/500	Molecular Probes

RESULTATS & DISCUSSION

1 Introduction

Nous avons mis au point un modèle d'expositions à des doses répétées et sub-létales d'UV-B chez les kératinocytes N-htert. Véronique Vallery a tout d'abord déterminé les conditions de stress sub-létales qui entraînent, à long terme, l'arrêt de la prolifération sur cette lignée. Une courbe d'intensité d'UV-B a donc été réalisée pour déterminer la dose létale qui est de 500 mJ/cm².

Le modèle mis au point consiste à exposer les kératinocytes N-htert à huit stress à des doses sub-létales de 300 mJ/cm² d'UV-B. Un stress est réalisé quatre fois par jour à raison d'un stress toutes les deux heures et cela pendant deux jours. Ces huit stress sont suivis de 64 heures de récupération. Des cellules contrôles sont traitées en parallèle mais en l'absence d'UV-B. Les extractions protéiques ont été réalisées après 30, 90 minutes et 3 heures de récupération (temps dits courts) et après 16, 40 et 64 heures de récupération (temps dits longs) (**Figure 1**).

L'arrêt de la prolifération entraîné par les expositions aux UV-B est visible à 16, 40 et 64 heures de récupération lorsqu'on observe les cellules au microscope optique. Nous pouvons également observer les changements morphologiques dus aux stress dans ces conditions. Ces changements morphologiques apparaissent principalement après 40 heures de récupération après les expositions aux UV-B (**Figure 2**).

Lors de ce mémoire, nous étudierons tout d'abord les profils d'abondance de ces protéines au cours de la récupération des cellules après les expositions aux UV-B. Notre deuxième objectif sera d'approfondir les voies de signalisation impliquées dans l'activation par phosphorylation de certaines de ces protéines en cherchant si un lien existe entre la kératine 8, CapG et les MAPK ERK, JNK et p38^{MAPK}.

Les résultats sont composés de trois parties. La première partie présente les mises au point qui ont été nécessaires. La seconde partie présente l'établissement du profil d'abondance des protéines étudiées lors de la phase de récupération qui suit les huit expositions sub-létales aux UV-B. Une troisième partie s'intéressera à l'établissement de profils d'abondance entre les stress.

1.1 Les mises au point

1.1.1 Etude des marqueurs induits par les stress aux UV-B : influence de la confluence des cellules

(Figures 3 a et b)

Pour chaque expérience réalisée, nous appelons "biomarqueurs" l'abondance relative de l'ARNm de gènes marqueurs de la réponse aux UV-B dans ces conditions 64 heures après le dernier stress. Ces biomarqueurs étudiés sont p21^{WAF-1}, inhibiteur du cycle cellulaire qui aboutit à un arrêt prolifératif, la métalloprotéinase 9 (MMP-9), protéase impliquée dans le remodelage de la matrice extracellulaire, et un marqueur tardif de différenciation, l'involucrine. L'étude de ces biomarqueurs est réalisée grâce à la technique de RT-PCR en temps réel, décrite dans la partie "Matériel et méthodes". Le gène de la Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase (GAPDH), enzyme impliquée dans la glycolyse, est utilisé comme gène de référence car son expression demeure inchangée dans les cellules "contrôles" et les cellules exposées aux UV-B.

La première cinétique présentée constitue une expérience typique durant laquelle les cellules contrôles, qui n'ont pas été exposées aux UV-B, n'ont pas atteint la confluence au moment de l'étude des biomarqueurs, c'est-à-dire 64 heures après le dernier stress aux UV-B (**Figure 3a**). Les résultats de cette première cinétique montrent qu'après 64 heures de récupération, les abondances relatives d'ARNm de p21^{WAF-1}, de MMP-9 et de l'involucrine sont augmentées dans les cellules exposées aux UV-B par rapport aux cellules « contrôles » respectivement de 2,9 x, 1,8 x et de 3,0 x (**Figure 3a**).

Lorsque les cellules « contrôles » sont confluentes (**Figure 3b**), celles-ci arrêtent de proliférer. Nous pouvons observer dans ce cas que l'abondance relative de l'ARNm p21^{WAF-1} ne semble pas varier entre les cellules "contrôles" et les cellules exposées aux UV-B. Cependant, la valeur du nombre critique de cycles de PCR en temps réel auquel l'ARNm de p21^{WAF-1} devient détectable chez les cellules "contrôles" confluentes, est bien inférieur au nombre critique de cycles auquel l'ARNm de p21^{WAF-1} devient détectable chez les cellules "contrôles" non confluentes. Ceci indique que la confluence des cellules augmente l'abondance relative de l'ARNm de p21^{WAF-1}.

Quant aux autres biomarqueurs, les résultats de cette cinétique montrent qu'après 64 heures de récupération, les abondances relatives d'ARNm de MMP-9 et de l'involucrine sont augmentées dans les cellules exposées aux UV-B par rapport aux cellules « contrôles » respectivement de 5,8 x et de 6 x.

1.1.2 Contrôle positif du récepteur EGF actif

Motivations et démarche expérimentale

Le récepteur de l'EGF pourrait être impliqué dans la cascade de signalisation amenant l'augmentation de l'abondance et/ou la phosphorylation des trois protéines d'intérêt : CapG, la kératine 8 et Hsp27 (Rittie and Fisher 2002). Afin d'avoir un contrôle positif de l'activation du récepteur, nous avons stimulé les kératinocytes N-htert avec de l'EGF (10 ng/ml). Le but de cette expérience est d'activer le récepteur EGF qui va s'autophosphoryler. La forme phosphorylée de ce récepteur est ensuite détectée par Western blot à l'aide d'un anticorps spécifique.

Les extractions protéiques ont été réalisées à différents temps suivant la stimulation : 5, 30, 90 minutes et 3 heures après la stimulation, ce qui nous a donné un aperçu de la durée d'activation du récepteur. La phosphorylation de la protéine ERK (appartenant à la famille des "Mitogen Activated Protein") est située en aval de la cascade de signalisation déclenchée par le récepteur EGF. On peut aussi détecter cette phosphorylation par Western blot.

Observations

(Figure 4)

Une extraction protéique a été réalisée avant la stimulation et représente le point de départ, nommé temps 0 (T0).

La forme phosphorylée, et donc active, du récepteur EGF est décelée très peu de temps après la stimulation. En effet, nous pouvons la détecter dès les 5 premières minutes, ce qui traduit un processus d'activation du récepteur rapide. L'abondance de la forme phosphorylée semble ensuite vite diminuer, comme nous pouvons le constater à 30 minutes et surtout à 90 minutes pour revenir à un niveau similaire à celui des cellules "contrôles" non stimulées à 3 heures après la stimulation.

La phosphorylation de la protéine ERK suit la cinétique de la forme phosphorylée du récepteur et semble persister encore à 3 heures après la stimulation, suggérant peut-être une action à plus long terme.

Conclusion

Nous avons donc utilisé les extractions protéiques réalisées à 5 minutes après la stimulation à l'EGF comme contrôle positif de l'activation du récepteur EGF activé dans toutes les expériences réalisées par la suite.

1.1.3 Choix du tampon de lyse

Des tests ont été effectués pour comparer les deux tampons de lyse dits : "Biosource" et "DLA" dans la partie « Matériel et méthodes » car leur composition différente influence peut-être la détection par Western blot de certaines protéines ou de leurs formes phosphorylées.

Des cellules "contrôles" ou exposées aux UV-B (CTL ou UVB) ont été détachées de leur support avec la trypsine, rincées puis centrifugées avant la lyse dans le tampon "DLA" et le tampon "Biosource". Nous avons aussi essayé de lyser les cellules "contrôles" et d'en extraire les protéines en les raclant directement dans les boîtes de culture avec le tampon de lyse "DLA" ou "Biosource". Nous avons ensuite essayé de mettre en évidence par Western blot les kératines 6 et 8 et les formes phosphorylées éventuelles de la kératine 8 (sérine 73 et 431) (**Figure 5**).

Nous pouvons observer sur la figure 5, que les bandes qui correspondent aux kératines 6, 8 et aux deux types de phosphorylation de cette dernière sur les sérines 73 et 431, sont bien visibles lorsque l'extraction protéique est réalisée sur le culot cellulaire avec du tampon "DLA" et pratiquement pas détectées, excepté pour la kératine 8, lorsque l'extraction protéique est réalisée avec le tampon "Biosource". Nous avons utilisé l' α -tubuline comme protéine de référence.

Ensuite, deux types d'extraction ont été comparés pour les deux tampons. D'une part en raclant directement dans les boîtes de culture avec le tampon et d'autre part en utilisant de la trypsine et en lysant avec le tampon (**Figure 6**).

Nous pouvons à nouveau remarquer que contrairement à ce que l'on observe en utilisant le tampon de lyse "DLA", les deux types de phosphorylation de la kératine 8 ne sont pas mises en évidence lorsque l'extraction est réalisée avec le tampon "Biosource" et cela, pour les deux techniques d'extraction.

En conclusion, les extractions protéiques seront réalisées dans la suite de ce travail en raclant les cellules directement dans les boîtes de culture avec le tampon "DLA".

Nous analyserons les résultats obtenus pour les kératines 6 et 8 dans ces conditions de raclage et de lyse plus loin dans ce travail.

2 Profil d'abondance des protéines d'intérêt lors de la réponse des kératinocytes après expositions répétées à des doses sub-létales aux UV-B pendant la récupération

2.1 Motivations et démarche scientifique

Le but de cette expérience est de caractériser le profil d'abondance et la localisation cellulaire des protéines étudiées et le cas échéant de leur forme phosphorylée, au cours de la récupération des kératinocytes humains N-htert, après les huit expositions sub-létales à 300 mJ/cm² d'UV-B et ce, jusqu'à 64 heures après le dernier stress.

Un stress peut également influencer la localisation cellulaire d'une protéine et peut la faire varier au cours du temps. Des observations sur la localisation cellulaire d'une protéine peuvent être réalisées par un marquage en immunofluorescence, visualisée en microscopie confocale. Les résultats obtenus avec cette approche peuvent être comparés à ceux obtenus par Western blot. Pour mettre en évidence ces variations au cours du temps, des marquages par immunofluorescence ont été réalisés à 16, 40 et 64 h après le dernier stress.

2.2 CapG

Pour rappel, CapG est une protéine de coiffe de l'actine qui intervient dans la mobilité cellulaire ainsi que dans la réorganisation du cytosquelette cellulaire suite à un stimulus. Cette protéine est localisée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Silacci, Mazzolai et al. 2004).

2.2.1 Profil d'abondance et localisation cellulaire de CapG au cours de la récupération après exposition aux UV-B

Marquage par immunofluorescence de CapG

La protéine CapG est mise en évidence en vert par un marquage immunohistochimique grâce à un anticorps anti-CapG qui est lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome émettant dans le vert. Les noyaux sont quant à eux marqués au TO-PRO 3 (émission bleue). Nous avons mis en évidence une augmentation de l'abondance de la protéine CapG (**Figure 7a**) dans les cellules exposées à huit stress sub-létaux d'UV-B (UVB) à 16, 40 et 64 heures après le dernier stress par rapport aux cellules « contrôles ».

Nous pouvons par ailleurs observer la formation d'un anneau de CapG en périphérie de certaines cellules exposées aux UV-B à 40 et 64 heures après le dernier stress. Cette organisation n'étant pas visible chez les cellules contrôles, nous nous sommes demandés ce qu'il en était au niveau de l'actine. L'actine subissait-elle, elle aussi, une réorganisation suite aux stress aux UV-B ? En effet, rappelons que CapG est une protéine de coiffe de l'actine et peut moduler son organisation (Silacci, Mazzolai et al. 2004).

CapG et l'actine sont-elles co-localisées ?

Afin de mettre en évidence une éventuelle co-localisation de ces protéines, un deuxième marquage par immunofluorescence a été réalisé, mettant en évidence l'actine en rouge. CapG

est mis en évidence en vert. Les noyaux sont marqués au TO-PRO 3 qui émet dans le bleu. Ces résultats sont présentés à la **Figure 7b**.

Nous pouvons observer une augmentation de l'abondance de CapG dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau des cellules exposées aux UV-B (UVB) par rapport aux cellules contrôles (CTL) aux trois temps étudiés, c'est-à-dire après 16, 40 et 64 heures de récupération après le dernier stress. L'abondance de l'actine ne semble pas varier d'une condition à l'autre.

Nous pouvons également observer que la localisation de CapG semble tout d'abord diffuse dans l'ensemble du cytoplasme des cellules exposées aux UV-B, après 16 heures de récupération. Après 40 et 64 heures de récupération, on observe la formation d'un anneau en périphérie de la cellule. Cet anneau semble montrer une co-localisation de CapG et de l'actine car il apparaît en jaune sur les micrographies.

2.2.2 Discussion

Les résultats obtenus dans ce modèle expérimental montrent, premièrement, que l'abondance de la protéine CapG est augmentée après que les cellules aient été exposées aux UV-B, deuxièmement qu'une réorganisation de la protéine CapG est également observable chez les cellules exposées aux UV-B, à 40 et 64 heures après le dernier stress et troisièmement, que l'actine et CapG sont co-localisées dans les cellules exposées aux UV-B après 40 et 64 heures de récupération.

L'augmentation de l'abondance de CapG suite à un stimulus ou un stress a déjà été mise en évidence chez les cellules endothéliales (Pellieux 2003). En effet, le stress généré par les forces de cisaillement sur les cellules endothéliales conduit à un changement morphologique, à un alignement cellulaire dans le sens du flux sanguin et à l'induction de plusieurs protéines impliquées dans ces processus dont CapG. Une augmentation de la liaison de CapG à l'actine (coiffage) a également été mise en évidence dans ces conditions, ce qui inhibe la polymérisation de l'actine et participe activement à la réorganisation du cytosquelette, causant des changements morphologiques et l'alignement des cellules endothéliales dans la direction du flux sanguin.

Une réorganisation de l'actine suite à la surexpression de CapG par transfection a été observée chez les fibroblastes CV1 (Sun, Kwiatkowska et al. 1995). Une diminution de l'abondance de l'actine au centre de la cellule et une augmentation de cette abondance à la circonférence cellulaire furent mises en évidence dans cette étude.

Les résultats obtenus chez les kératinocytes N-htert exposés aux UV-B permettent de proposer l'hypothèse que la formation de l'anneau en périphérie de la cellule pourrait participer aux changements morphologiques observés.

Il a été montré que CapG joue également un rôle dans la mobilité cellulaire (Witke 2001). Par exemple, l'abondance de CapG dans les macrophages, cellules très mobiles, est très élevée par rapport aux autres types cellulaires. Il a été démontré que les macrophages qui ne possédaient pas de CapG « CapG-null macrophages » présentaient une mobilité défectueuse (Witke, Li et al. 2001). Dès lors, une augmentation de l'abondance de CapG dans les kératinocytes exposés aux UV-B ne favoriserait-elle pas leur mobilité ? Les expositions aux UV-B engendreraient-elles un signal de migration cellulaire ? On sait que lors du processus de cicatrisation épidermique, les kératinocytes environnant la zone lésée migrent et prolifèrent sur les bords épidermiques qu'ils recouvrent totalement par une couche monocellulaire, aboutissant finalement à la reconstitution de l'épiderme stratifié. Nous savons également que pour migrer, les cellules doivent moduler leur morphologie cellulaire et l'organisation de leur cytosquelette (Rivero, Koppel et al. 1996).

2.3 La kératine 8

Pour rappel, la kératine 8 est exprimée préférentiellement dans les épithéliums simples glandulaires et s'associe avec la kératine 18 pour former des filaments intermédiaires. Il a été montré que la kératine 8 était phosphorylée sur la sérine 73 lors d'expositions aux UV-B, lors de l'apoptose et également lors de la mitose (Liao, Ku et al. 1997). Par ailleurs, elle serait phosphorylée sur le résidu de sa sérine 431 après une stimulation à l'EGF (Ku and Omary 1997).

Une étude protéomique préalable sur les kératinocytes N-htert ayant montré une augmentation de l'abondance de la kératine 8 après exposition aux UV-B, et cette dernière pouvant être phosphorylée dans diverses conditions expérimentales, nous avons étudié l'abondance et la phosphorylation de cette protéine dans notre modèle.

2.3.1 Profil d'abondance et phosphorylation de la kératine 8 au cours de la récupération après exposition aux UV-B

(Figure 8)

Ces résultats ont été obtenus par plusieurs Western blots réalisés à partir d'échantillons protéiques extraits avec le tampon DLA à différents temps après le dernier stress. Deux expériences indépendantes ont été réalisées.

L'abondance de la kératine 8 semble augmenter légèrement dans les cellules exposées après 16, 40 et 64 heures après les expositions aux UV-B (UV), par rapport aux cellules « contrôles » (CTL).

Comme le montre la figure 8, les formes phosphorylées de la kératine 8 sur la sérine 73 (K8PS73) et 431 (K8PS431) sont présentes à chaque temps et dans les deux conditions, à savoir dans les cellules exposées à des doses répétées et sub-létales d'UV-B (UV) et dans les cellules « contrôles » (CTL).

Il n'y a pas de différence décelable d'abondance de la K8PS73 entre les cellules « contrôles » (CTL) et les cellules exposées aux UV-B (UV) aux temps dits courts après les expositions aux UV-B, c'est-à-dire après 30, 90 minutes et 3 heures de récupération. Cependant, nous pouvons observer que l'abondance de K8PS73 augmente à 16, 40 et 64 heures de récupération suivant le dernier stress, par rapport aux cellules « contrôles ». C'est ce que nous appelons la réponse à long terme.

L'abondance de K8PS431 augmente chez les cellules exposées aux UV-B après 16, 40 et 64 heures de récupération. Nous pouvons observer une légère augmentation de l'abondance de la K8PS431 lors d'une stimulation à l'EGF.

2.3.2 Profil d'abondance et localisation cellulaire de la kératine 8 et de ses deux types de phosphorylation au cours de la récupération après exposition aux UV-B

Les marquages par immunofluorescence commentés aux figures 9, 10a, 10b, 11a et 11b mettent en évidence soit la kératine 8, soit la forme phosphorylée de la kératine 8 sur la sérine 73 (K8PS73) ou sur la sérine 431 (K8PS431). Ces marquages apparaissent en vert. Les noyaux sont marqués par le TO-PRO 3 qui émet dans le bleu. Deux techniques de fixation et perméabilisation ont été testées pour mettre en évidence les formes phosphorylées : la première utilise de la paraformaldéhyde pour fixer et du Triton pour perméabiliser les cellules, tandis que la deuxième utilise de l'acétone qui permet de réaliser ces deux étapes simultanément.

L'abondance de la kératine 8, principalement visible dans le cytoplasme des cellules, semble augmenter faiblement à 16, 40 et 64 heures après expositions aux UV-B par rapport aux cellules « contrôles » (**Figure 9**).

La K8PS73 semble se localiser dans le noyau. Une abondance différentielle de cette forme phosphorylée est détectée entre les cellules exposées aux UV-B et les cellules « contrôles » : cette abondance augmente dans les cellules stressées après 40 et 64 heures de récupération. Ces observations ont été mises en évidence en utilisant les deux techniques de fixation/perméabilisation (**Figures 10a et 10b**).

La K8PS431 est légèrement visible dans le cytoplasme ainsi que dans le noyau des cellules « contrôles ». Les expositions répétées aux UV-B entraînent une forte augmentation de cette forme qui est visible dans le cytoplasme et dans les noyaux après 16, 40 et 64 heures de récupération. Des résultats similaires ont été obtenus avec les deux techniques de fixation/perméabilisation utilisées (**Figures 11a et 11b**).

2.3.3 Discussion

Nos résultats montrent une légère augmentation de l'abondance de la kératine 8 à 16, 40 et 64 heures après le dernier stress aux UV-B. Un des rôles connus de la kératine 8 a été mis en évidence, celle-ci jouerait un rôle de protection dans différents modèles de pancréatite (Toivola, Baribault et al. 2000).

Nous avons observé que les expositions répétées de kératinocytes N-htert aux UV-B engendrent, dès 16 heures de récupération, la phosphorylation de la kératine 8 au niveau de ses deux sites de phosphorylation, c'est-à-dire sur les sérines 73 et 431.

Par ailleurs, les marquages par immunofluorescence nous informent que K8PS73 est localisée plutôt dans le noyau. Ceci a déjà été observé en réponse à divers stress comme un choc thermique ou une infection virale (Liao, Ku et al. 1997).

La K8PS431 semble dépendre de l'état d'activation du récepteur EGF. En effet, il a été démontré que l'abondance de cette forme phosphorylée augmente après avoir stimulé des cellules avec de l'EGF (Ku and Omary 1997). Par ailleurs, il a été montré que le récepteur de l'EGF peut être activé par les UV (Rittie and Fisher 2002). Dans notre modèle, il se pourrait que les UV-B activent le récepteur de l'EGF, déclenchant ainsi une voie de signalisation qui pourrait aboutir à la phosphorylation de la kératine 8 sur la sérine 431.

Une étude récente a montré que l'anticorps utilisé pour détecter la phosphorylation sur la kératine 8 phosphorylée sur la sérine 73 reconnaissait également la forme phosphorylée de la kératine 6. Un motif commun se retrouve en effet dans plusieurs kératines de type II (kératines 4, 5, 6 et 8) et constituerait un site consensus de phosphorylation. Suite à des

stimuli mitogènes, ou pro-apoptotiques, ces quatre kératines sont phosphorylées sur ce motif. La phosphorylation serait associée à la solubilisation des kératines, la réorganisation du cytosquelette et pourrait être réversible. Ces phosphorylations permettraient au réseau de kératine d'être plus soluble et donc faciliteraient les changements morphologiques (Toivola, Baribault et al. 2000) (Ku and Omary 1997).

Parmi ces quatre kératines, nous nous sommes intéressés à la kératine 6, car une augmentation de son abondance a été aussi mise en évidence au laboratoire sur notre modèle d'étude à 64 heures après le dernier stress aux UV-B.

2.4 La kératine 6

Dans des conditions normales, la kératine 6 est faiblement exprimée dans l'épiderme. Elle semble jouer un rôle dans diverses situations pathologiques comme les lésions cutanées, une différenciation anormale, une hyperprolifération des épithéliums stratifiés et également dans le processus de cicatrisation.

2.4.1 Profil d'abondance de la kératine 6 au cours de la récupération après exposition aux UV-B

Nous avons observé, par Western blot, une augmentation de l'abondance de la kératine 6 chez les cellules préalablement exposées aux UV-B, par rapport aux cellules contrôles (**Figure 12**). Cette augmentation est visible après 16, 40 et 64 heures de récupération des cellules après le dernier stress. Aucune modification d'abondance n'est visible dans les temps courts, c'est-à-dire après 30, 90 minutes et 3 heures de récupération après les expositions aux UV-B.

2.4.2 Discussion

Les expositions répétées et sub-létales aux UV-B mènent à une augmentation de l'abondance de la kératine 6 après 16, 40 et 64 heures de récupération. La kératine 6 est connue pour être induite par des dommages causés à la peau ou à d'autres épithéliums stratifiés (Coulombe and Omary 2002). En effet l'expression des kératines 6, 16 et 17 augmente fortement dans les kératinocytes bordant la blessure lors du processus de la cicatrisation des tissus (Mazzalupo, Wong et al. 2003).

Le rôle de la kératine 6 dans la migration cellulaire lors du processus de cicatrisation a été mis en évidence dans plusieurs études (Wong and Coulombe 2003). En effet, les kératinocytes bordant les plaies doivent migrer pour rapprocher les lèvres de la plaie. Cette augmentation d'expression revient à la normale une fois le processus de cicatrisation terminé (Freedberg, Tomic-Canic et al. 2001). On retrouve donc ici la suggestion que les UV-B pourraient modifier les processus de migration des kératinocytes.

2.5 Hsp27

Hsp27 est impliquée dans la défense cellulaire contre les stress tels que les UV (Wong, Shi et al. 2000), dans la réorganisation du réseau d'actine (Guay, Lambert et al. 1997) mais également dans la différenciation des kératinocytes .

2.5.1 Profil d'abondance et phosphorylation de la protéine Hsp27 au cours de la récupération après exposition aux UV-B

L'abondance de la forme phosphorylée de Hsp27 augmente fortement dans les cellules exposées aux UV-B, après 30 et 90 minutes de récupération (**Figure 13**). Une abondance plus

élevée est maintenue dans les temps plus longs, c'est-à-dire après 16, 40 et 64 heures de récupération, par rapport aux cellules « contrôles ». Ces résultats ont été reproduits trois fois.

L'abondance de la forme totale de Hsp27 semble assez stable tout au long de la cinétique. Néanmoins, une légère différence d'expression de Hsp27 apparaît parfois dans les cellules exposées aux UV-B à 16 et 40 heures après le dernier stress.

2.5.2 Discussion

La forme de Hsp27 phosphorylée sur la sérine 82 montre une abondance plus élevée dans les cellules après exposition aux UV-B. Il a été démontré que de nombreux facteurs de stress, comme les UV, engendrent la phosphorylation de Hsp27. Cette protéine peut être phosphorylée en quelques minutes après un stress (environ 30 minutes selon le type cellulaire), ce que nous observons après 30 et 90 minutes de récupération dans les cellules qui ont été exposées aux UV-B (Nozaki, Takehana et al. 1997).

Des études ont montré que Hsp27 serait impliquée dans certaines voies de la transduction du signal, l'arrêt de la prolifération et la différenciation (Michishita, Hirayoshi et al. 1991). La phosphorylation de Hsp27 semble jouer un rôle important dans la réorganisation du cytosquelette et peut dépendre de $p38^{\text{MAPK}}$ (Guay, Lambert et al. 1997). En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de $p38^{\text{MAPK}}$ diminue la phosphorylation de Hsp27 induite par les UV-B (Wong, Shi et al. 2000).

2.6 $p38^{\text{MAPK}}$ et les autres MAPK

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce travail, plusieurs observations indiquent que la voie des MAPK est souvent impliquée dans les effets induits par les UV. De plus, $p38^{\text{MAPK}}$ a aussi été mise en relation avec nos protéines d'intérêt à plusieurs reprises. Nous n'excluons pas les implications des protéines ERK et JNK dans notre modèle.

D'emblée, notons que nous avons essayé de mettre en évidence la forme totale et la forme phosphorylée de JNK. Nous avons testé quatre anticorps pour détecter la forme totale et deux anticorps pour détecter la forme phosphorylée. Aucun de ces anticorps n'a donné de résultat analysable. Nous nous sommes donc concentrés sur $p38^{\text{MAPK}}$ et ERK.

2.6.1 Profil de phosphorylation de $p38^{\text{MAPK}}$ au cours de la récupération après exposition aux UV-B

$p38^{\text{MAPK}}$ et sa forme phosphorylée

L'évolution de l'abondance de la forme phosphorylée de $p38^{\text{MAPK}}$ présente quelques particularités (**Figure 14**). En effet, nous pouvons observer une augmentation de cette abondance après 30 et 90 minutes de récupération dans les cellules exposées aux UV-B (UV) par rapport aux cellules « contrôles » (CTL). Après 3 heures de récupération, cette abondance semble diminuer, retournant à un taux basal proche des cellules « contrôles ». Après 16 heures, la forme phosphorylée de $p38^{\text{MAPK}}$ dans les cellules exposées aux UV-B est moins abondante que dans les cellules « contrôles » ; ce phénomène s'accroît après 40 heures de récupération. À 64 heures après le dernier stress, nous pouvons observer une nouvelle augmentation de la forme phosphorylée de $p38^{\text{MAPK}}$ dans les cellules exposées aux UV-B. Nous observons que l'abondance totale de $p38^{\text{MAPK}}$ ne change pas au cours du temps. Ces résultats ont été reproduits trois fois.

La phosphorylation de $p38^{\text{MAPK}}$ ne semble pas induite par la stimulation à l'EGF.

Discussion

Nous pouvons remarquer que la phosphorylation de p38 est induite dans les cellules exposées aux UV-B, à 30 et 90 minutes après le dernier stress et à 64 heures après le dernier stress. Nous pouvons donc observer qu'il existe un profil d'activation biphasique de p38^{MAPK}. Un tel profil a déjà été démontré précédemment notamment lors de l'établissement de la sénescence induite prématurément par l'hydroperoxyde d'hydrogène (H₂O₂) chez des fibroblastes humains en culture : d'abord une activation précoce de p38 qui amène une seconde boucle d'activation à plus long terme (Fripiat, Dewelle et al. 2002).

Il a été montré que la phosphorylation de Hsp27 induite par différentes situations de stress dont les UV-B se trouve en aval de la cascade de p38^{MAPK} (Rouse, Cohen et al. 1994). Dans notre modèle, le profil de phosphorylation de Hsp27 suit en partie celui de p38^{MAPK} car sa phosphorylation est déjà présente à 30 et 90 minutes après exposition aux UV-B mais se maintient à tous les temps. Nous ne pouvons pas, dans notre travail, établir une relation de cause à effet entre la phosphorylation de p38^{MAPK} et celle de Hsp27 mais nous observons une corrélation du profil d'abondance de ces deux formes phosphorylées, la forme phosphorylée p38^{MAPK} et celle de Hsp27.

2.6.2 Profil de phosphorylation de ERK au cours de la récupération après exposition aux UV-B

ERK et sa forme phosphorylée

L'évolution de la forme phosphorylée de la protéine ERK présente également certaines particularités (**Figure 15**). Nous pouvons remarquer que l'abondance de cette forme est plus élevée dans les contrôles par rapport au point de départ (T0) et reste élevée tout le long de la cinétique.

Par rapport au temps T0, l'abondance de ERK phosphorylé semble augmenter après 30, 90 minutes et 3 heures de récupération dans les cellules exposées aux UV-B, tout en restant inférieure à l'abondance de la forme phosphorylée de ERK dans les cellules contrôles, puis diminuer après 16 et 40 heures de récupération.

Une nouvelle augmentation de la forme phosphorylée de ERK dans les cellules exposées aux UV-B a été mise en évidence à 64 heures après le dernier stress. A ce moment, l'abondance de la forme phosphorylée de ERK est plus élevée dans les cellules exposées aux UV-B que dans les cellules « contrôles ». Ces résultats ont été reproduits deux fois.

L'abondance de ERK ne change pas au cours du temps.

Notons que la phosphorylation de ERK est légèrement induite par la stimulation à l'EGF, constituant le contrôle positif.

Discussion

Nous n'observons pas d'induction de la phosphorylation de ERK dans les cellules exposées aux UV-B par rapport aux cellules contrôles sauf à 64 heures après le dernier stress.

L'abondance de la forme phosphorylée de ERK est plus élevée dans les cellules « contrôles », ceci peut être expliqué par le fait que ces cellules sont toujours en état de prolifération dans lequel la phosphorylation de ERK est impliquée.

Nous savons que les expositions répétées aux UV-B entraînent un arrêt prolifératif et nous observons une diminution de la forme phosphorylée de ERK dans les cellules stressées déjà après 16 heures de récupération, ces deux observations pourraient être liées.

L'augmentation détectée dans les cellules exposées aux UV-B après 64 heures de récupération pourrait être le signe que ces cellules aient récupéré et recommencent à proliférer ou qu'un autre processus impliquant la phosphorylation de ERK commence.

2.7 Le récepteur à l'EGF

Le récepteur à l'EGF, lorsqu'il est activé, se dimérise et s'autophosphoryle, déclenchant une voie de signalisation. Dans la littérature, ce récepteur a été lié aux protéines que nous étudions et il est donc intéressant d'observer ce qui se passe à ce niveau. Nous nous pencherons surtout sur la forme phosphorylée représentant l'état actif du récepteur.

2.7.1 Profil de phosphorylation du récepteur à l'EGF au cours de la récupération après exposition aux UV-B

(Figure 16)

Nous pouvons remarquer la présence de la forme phosphorylée dans les deux conditions étudiées. D'une façon générale, l'abondance de la forme phosphorylée du récepteur diminue au cours du temps dans les deux conditions tout en restant plus élevée dans les cellules « contrôles » que dans les cellules exposées aux UV-B.

Cette phosphorylation est fortement induite suite à une stimulation avec de l'EGF, ce qui constitue le contrôle positif.

2.7.2 Discussion

Plusieurs études ont démontré l'activation du récepteur EGF par les UV-B (Wang, Turlington et al. 2005) (Peus, Vasa et al. 1999) mais après une seule exposition, dont l'intensité variait selon les études. Nous nous attendions à observer une forte augmentation de la forme phosphorylée du récepteur EGF dans les cellules exposées aux UV-B par rapport aux cellules « contrôles », ce qui n'est pas le cas.

Notre modèle impliquant huit expositions répétées aux UV-B, pourrait-il influencer la réponse du récepteur au stress, au point de l'estomper ? Une autre hypothèse serait que le récepteur à l'EGF soit internalisé sous l'effet du ou des premiers stress et de ce fait, ne serait plus accessible pour être de nouveau activé.

Afin d'étudier si des changements se présentaient directement lors des expositions aux UV-B, nous avons donc décidé de déterminer l'abondance protéique du récepteur de l'EGF entre les stress. Les extractions protéiques ont été réalisées juste après le premier stress, juste après le quatrième stress, après la récupération entre les deux jours de stress, juste après le cinquième stress et enfin, juste après le huitième stress. Afin de comparer cette cinétique aux autres réalisées auparavant, nous avons conservé des temps assez longs, c'est-à-dire après 6, 16, 40 et 64 heures de récupération.

3 Etude des protéines impliquées entre les stress sub-létaux aux UV-B et pendant la récupération

3.1 Motivations et démarche scientifique

Dans le point précédent, nous avons caractérisé l'évolution de l'abondance des protéines étudiées et éventuellement de leur forme phosphorylée pendant la récupération qui suit huit stress sub-létaux sous UV-B. Le but des expériences suivantes est de caractériser l'abondance de ces protéines entre les stress aux UV-B. En effet, les phosphorylations sont un type de modifications protéiques qui s'effectuent assez rapidement suivant la stimulation ou le stress. C'est pourquoi, nous avons recommencé une série de stress en réalisant les extractions dans les 5 minutes suivant les stress.

Les kératinocytes humains N-htert sont exposés à huit doses d'intensité sub-létale d'UVB de 300 mJ/cm^2 , réparties en quatre fois par jour pendant deux jours.

Les extractions protéiques ont été réalisées 5 minutes après le premier stress, après le quatrième, après une nuit de récupération entre les 2 jours de stress, après le cinquième et après le dernier stress aux UV-B (**Figure 17**).

Ensuite, nous avons effectué des extractions après 6, 16, 40 et 64 heures de récupération. En conservant ces temps longs, analysés lors des cinétiques précédentes, nous espérons comparer toutes les cinétiques entre elles à ces temps. Nous avons opté pour un temps de 6 heures au vu des résultats souvent négatifs à 3 heures dans les expériences précédentes.

3.2 Le récepteur de l'EGF

3.2.1 **Profil d'abondance et phosphorylation du récepteur de l'EGF entre les stress et au cours de la récupération après exposition UV-B**

Nous n'observons pas de différence d'abondance de la forme phosphorylée du récepteur de l'EGF entre les cellules exposées aux UV-B et les cellules "contrôles" après le premier stress (**Figure 18**). Une augmentation de l'abondance de cette forme phosphorylée est visible dans les deux conditions après le quatrième stress et après les 16 heures de récupération entre les deux jours de stress. Cette abondance diminue dans les deux conditions après le cinquième et le huitième stress aux UV-B.

À 6, 16, 40 et 64 heures après le dernier stress aux UV-B, nous observons que la forme phosphorylée du récepteur de l'EGF est plus abondante dans les cellules "contrôles" que dans les cellules exposées aux UV-B. De manière générale, l'activation du récepteur de l'EGF est plus importante lorsqu'elle est induite par les ligands (EGF) par rapport aux expositions aux UV-B.

L'abondance de la forme totale du récepteur de l'EGF dans les cellules "contrôles" et les cellules exposées aux UV-B est stable du premier stress aux UV-B aux 16 heures de récupération entre les deux jours de stress. Nous observons une diminution de cette abondance dans les cellules exposées aux UV-B par rapport aux cellules "contrôles" après le cinquième et le huitième stress, et après 6 et 16 heures de récupération après les stress aux UV-B. Cette abondance, dans les cellules exposées aux UV-B, augmente et devient similaire

au niveau des cellules "contrôles" après 40 et 64 heures de récupération après les stress aux UV-B.

3.3 **p38^{MAPK} et les autres MAPK**

3.3.1 **Profil d'abondance et phosphorylation de p38^{MAPK} entre les stress et au cours de la récupération après exposition aux UV-B**

Nous pouvons observer une augmentation de l'abondance de la forme phosphorylée de p38^{MAPK} dans les cellules exposées aux UV-B par rapport aux cellules « contrôles », après le quatrième stress et de nouveau après le huitième stress (**Figure 19**).

Entre le quatrième et le huitième stress et à partir de 6 heures de récupération après le dernier stress, nous pouvons remarquer que cette abondance diminue.

Comme nous l'avons décrit lors des cinétiques précédentes mais de façon moindre, nous observons une légère augmentation de la forme phosphorylée de p38^{MAPK} après 64 heures de récupération mais ici, dans les deux conditions.

L'abondance de la forme totale de p38^{MAPK} est assez constante entre les cellules exposées aux UV-B et les cellules « contrôles » tout au long de la cinétique.

3.3.2 **Profil d'abondance et phosphorylation de ERK entre les stress et au cours de la récupération après exposition UV-B**

La forme phosphorylée de ERK est pratiquement absente dans les cellules « contrôles » et dans les cellules exposées aux UV-B après le premier stress (**Figure 20**). Son abondance augmente légèrement dans les deux conditions après le quatrième stress et fortement entre les deux jours de stress. Après 16 heures de récupération après les quatre premiers stress, nous pouvons alors remarquer que l'abondance de la forme phosphorylée de ERK est plus élevée dans les cellules exposées aux UV-B que dans les cellules « contrôles ».

Nous observons ensuite, pour le second jour de stress (stress 5 et 8), un profil similaire à celui mis en évidence le premier jour (après les stress 1 et 4).

Une augmentation de l'abondance de la forme phosphorylée de ERK est détectée dans les deux conditions à partir de 6 heures de récupération, l'abondance étant plus élevée dans les cellules « contrôles » après 6, 16 et 40 heures de récupération. ERK semble donc être phosphorylé dans les deux conditions pendant le repos entre les deux séries de quatre stress et au cours de la récupération après les huit stress. Nous savons que la voie de ERK est impliquée dans le processus de prolifération cellulaire (Shaeffer Weber 1999). Nous pourrions peut-être imaginer que lors de la récupération, la prolifération des cellules « contrôles » soit stimulée par exemple par le changement du milieu de culture. Il a d'ailleurs été montré que les kératinocytes arrivés à une certaine confluence, synthétisent eux-mêmes leurs propres facteurs de croissance. Il serait donc possible qu'au cours de la récupération après les huit stress, les cellules « contrôles » soient en pleine phase de prolifération.

Comme nous l'avons décrit pour les expériences présentées précédemment, une forte augmentation de la phosphorylation de ERK dans les cellules exposées aux UV-B est visible après 64 heures de récupération. Notons que la voie de ERK peut être impliquée dans d'autres processus et notamment celui de la différenciation (Schmidt 2000).

Nous pouvons aussi remarquer que la phosphorylation de ERK est légèrement induite par la stimulation à l'EGF.

Il est assez curieux de remarquer que le profil de la phosphorylation de ERK est pratiquement à l'inverse de celui de la phosphorylation de p38. Quand l'une est phosphorylée, l'autre l'est moins et inversement.

L'abondance de la forme totale de ERK1 et 2 ne montre pas de variation entre les cellules « contrôles » et les cellules stressées, entre les stress et tout au long de la cinétique.

3.4 Hsp27

3.4.1 Profil d'abondance et phosphorylation de la protéine Hsp27 entre les stress et au cours de la récupération après exposition aux UV-B

Nous pouvons observer que l'abondance de la forme phosphorylée sur la sérine 82 de Hsp27 (**Figure 21**) augmente dans les cellules exposées aux UV-B par rapport aux cellules "contrôles", après le quatrième stress et pas après le premier stress.

Nous observons une diminution de cette abondance dans les deux conditions après les 16 heures de récupération entre les deux jours de stress.

Une augmentation de l'abondance de la forme phosphorylée sur la sérine 82 de Hsp27 dans les cellules exposées aux UV-B par rapport aux cellules "contrôles", est de nouveau visible après le huitième stress et pas après le cinquième stress.

Cette abondance élevée dans les cellules exposées aux UV-B est toujours visible à 6 heures après le dernier stress et diminue à 16 et 40 heures après le dernier stress. L'abondance de cette forme phosphorylée diminue également dans les cellules "contrôles" à 16, 40 et 64 heures après le dernier stress.

Une nouvelle augmentation de l'abondance de la forme phosphorylée sur la sérine 82 apparaît dans les cellules exposées aux UV-B, après 64 heures de récupération.

3.5 CapG

3.5.1 Profil d'abondance de CapG entre les stress et au cours de la récupération après exposition aux UV-B

L'abondance de CapG semble plus élevée dans cellules exposées aux UV-B que dans les contrôles et cela, tout au long de la cinétique (**Figure 22**).

Nous n'observons pas de variation de l'abondance de CapG au début de la cinétique. Par contre, une augmentation de son abondance est visible dans les cellules exposées aux UV-B déjà après 6 heures de récupération après le dernier stress et se maintient après 16, 40 et 64 heures de récupération. Ceci confirme les résultats mis en évidence dans les cinétiques précédentes caractérisant l'évolution de l'abondance de CapG au cours de la récupération après les huit stress.

3.6 La kératine 8

3.6.1 Profil d'abondance et phosphorylation de la kératine 8 entre les stress et au cours de la récupération après exposition aux UV-B

L'abondance de la forme phosphorylée sur la sérine 73 de la kératine 8 (K8PS73) (**Figure 23**) semble très faible après le premier et le quatrième stress aux UV-B dans les deux

conditions. Après 16 heures de récupération entre les deux journées de stress, l'abondance de K8PS73 augmente légèrement dans les deux conditions puis disparaît après le cinquième stress. Une nouvelle augmentation est visible dans les deux conditions après le dernier stress. Nous pouvons remarquer que l'abondance de cette forme phosphorylée devient faiblement plus élevée dans les cellules exposées aux UV-B par rapport aux cellules « contrôles », après 6 heures de récupération, de plus en plus élevée entre 16 et 40 heures de récupération et diminue ensuite après 64 heures. La kératine 8 ne semble pas phosphorylée sur sa sérine 73 suite à la stimulation à l'EGF.

Nous pouvons remarquer que l'abondance de K8PS431 (**Figure 24**) présente la même évolution au cours du temps que K8PS73. En effet, nous observons une augmentation de cette K8PS431 après la récupération entre les deux journées de stress, ensuite une diminution après le cinquième stress, et une augmentation progressive après le dernier stress. Nous pouvons alors remarquer que l'abondance de cette forme phosphorylée devient plus élevée dans les cellules exposées aux UV-B par rapport aux cellules « contrôles », après 6 heures de récupération et de plus en plus entre 16 et 64 heures de récupération.

Nous observons également que la stimulation des kératinocytes NhTERT avec l'EGF mène à la phosphorylation sur la sérine 431 de la kératine 8, comme décrit dans la littérature (Ku and Omary 1997).

En ce qui concerne la forme totale de la kératine 8, son abondance semble plus élevée dans les cellules exposées aux UV-B par rapport aux cellules « contrôles » et cela, tout au long de la cinétique (**Figure 24**). Ces observations sont cependant plus démonstratives juste après le huitième stress mais surtout pendant la récupération des cellules, c'est-à-dire après 6, 16, 40 et 64 heures de récupération. Néanmoins, cette augmentation est moins marquée que pour celle des formes phosphorylées de la kératine 8.

3.7 La kératine 6

3.7.1 Profil d'abondance de la kératine 6 entre les stress et au cours de la récupération après exposition aux UV-B

Nous pouvons observer que l'abondance de la kératine 6 est plus élevée dans les cellules exposées aux UV-B que dans les cellules « contrôles » après le premier stress, après le quatrième stress et après les 16 heures de récupération entre les deux jours de stress (**Figure 25**). Notons que l'abondance dans ces cellules « contrôles » est plus élevée à ces trois temps, c'est-à-dire après le premier stress, après le quatrième et après les 16 heures de récupération entre les deux jours de stress, que dans les cellules « contrôles » suivantes.

Après les cinquième et huitième stress, son abondance revient à un niveau plus bas. Ensuite, l'abondance de la kératine 6 augmente dans les cellules exposées aux UV-B après 6, 16, 40 et 64 heures de récupération.

3.8 Discussion

Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence l'activation du récepteur de l'EGF par les UV-B dans notre modèle. Il existe plusieurs sites de phosphorylation sur des résidus tyrosines au niveau du récepteur de l'EGF, qui ne sont pratiquement pas spécifiés dans les travaux publiés au sujet de l'activation de ce récepteur. Il a par ailleurs été démontré que le ligand EGF entraîne la phosphorylation de tous ces sites. Une explication possible est que le site de phosphorylation que nous avons étudié, sur le résidu tyrosine 1173 (Y1173), n'est peut-être pas impliqué dans l'activation de ce récepteur par les UV-B.

Par exemple, il a été démontré que les UV entraînaient l'activation de p38^{MAPK} et du récepteur de l'EGF chez les kératinocytes (Wang, Turlington et al. 2005). La longueur d'onde utilisée lors de ces expériences appartenait à la gamme des UV-C et le site de phosphorylation était sur le résidu tyrosine 1068 (Y1068). Nous pourrions peut-être proposer que l'activation d'un des sites de phosphorylation du récepteur de l'EGF dépend peut-être du stimulus, et peut-être même du type d'UV ?

Il a été montré par immunofluorescence qu'un rassemblement des récepteurs de l'EGF et une internalisation de ceux-ci, sont entraînés après exposition aux UV-B.

Nous avons remarqué que l'activation du récepteur de l'EGF dans les cellules "contrôles" est plus importante que dans les cellules exposées aux UV-B, après 6, 16, 40 et 64 heures de récupération. Ces observations peuvent être interprétées comme le signe d'un processus de prolifération dans les cellules "contrôles". Nous savons que les cellules exposées aux UV-B arrêtent de proliférer. Il a été démontré que lorsque les kératinocytes ont atteint la confluence, ils synthétisent eux-mêmes de l'EGF, ce qui entraîne une auto-activation des récepteurs de l'EGF.

Les résultats de cette expérience nous permettent de confirmer la plupart des observations faites au cours des premières études pendant la phase de récupération des cellules après les stress aux UV-B. CapG, et les différentes formes des kératines 6 et 8 voient leur abondance ou leurs phosphorylations augmenter principalement dès 6h de récupération après les huit stress, et ce au moins jusqu'à la fin de la récupération, à 64h.

Nous observons également une corrélation entre le profil d'abondance de la forme phosphorylée sur la sérine 82 de Hsp27 et celui de la forme phosphorylée de p38^{MAPK}. La diminution de l'abondance de cette forme observée après les 16 heures de récupération entre les deux jours de stress est une observation intéressante. Lorsque les cellules ont récupéré, la phosphorylation de Hsp27, impliquée dans la défense contre les stress, n'est plus nécessaire et son abondance peut revenir à un niveau basal.

Nous avons mis en évidence qu'un processus impliquant la phosphorylation de p38^{MAPK} intervient, pour des raisons inconnues, juste après le quatrième et le huitième stress. L'activation de cette voie concernerait principalement des mécanismes enclenchés de façon précoce après les stress et peut être aussi après 64 heures de récupération. Par contre, la phosphorylation de ERK semble intervenir plutôt au cours de la phase de récupération.

L'analyse de l'abondance des protéines étudiées entre les stress nous a fourni de nouvelles informations concernant les mécanismes impliqués dans la réponse aux stress. Nous savons maintenant que la phosphorylation de p38^{MAPK} est présente 5 minutes après le dernier stress aux UV-B. Rappelons que les extractions protéiques dans la première étude, c'est-à-dire au cours de la récupération après exposition aux UV-B, ont été réalisées après 30 minutes de récupération.

Nous pouvons remarquer qu'il existe un effet de la cumulation des stress. Par exemple, nous n'avons pas observé d'augmentation de la forme phosphorylée de p38^{MAPK} dans les cellules exposées aux UV-B après le premier stress mais par contre, nous l'observons après le quatrième stress. Ces mêmes observations sont répétées une deuxième fois lors des quatre stress suivants.

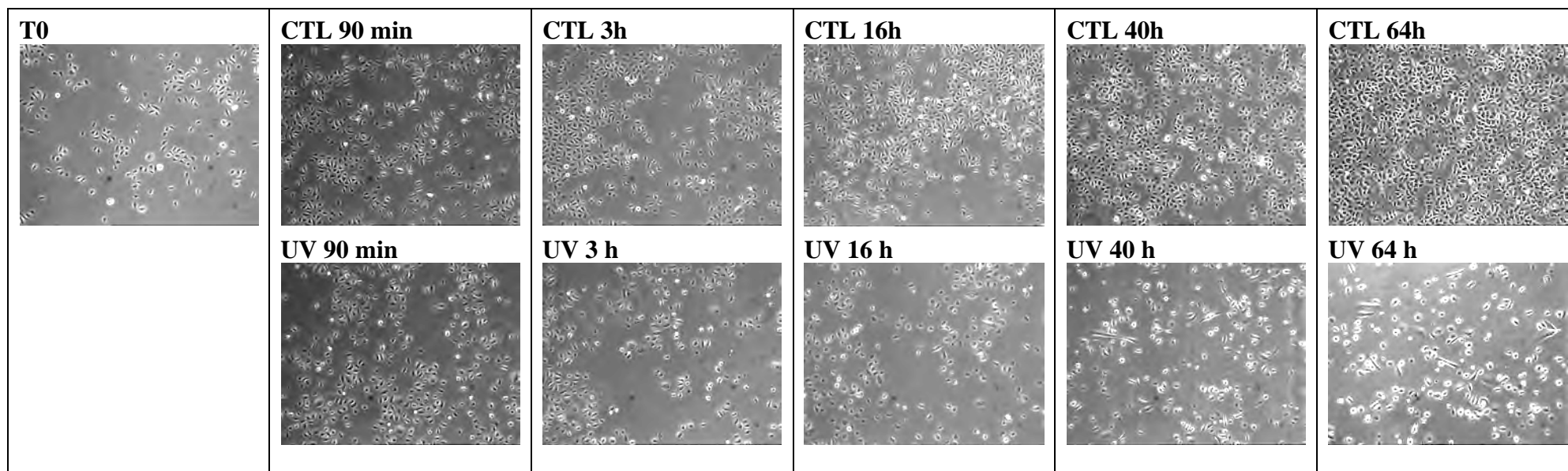


Figure 2 Influence des expositions répétées et sub-létales aux UV-B sur la prolifération et la morphologie des kératinocytes N-htert.

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales d'UV-B (300 mJ/cm² par stress), réparties en 4 fois par jour pendant deux jours (UV). Les cellules contrôles sont traitées en parallèle mais en l'absence d'UV-B (CTL). Les extractions protéiques ont été réalisées avec le tampon DLA après 30 (non montré), 90 minutes et 3 heures de récupération (temps dits courts) et après 16, 40 et 64 heures de récupération (temps dits longs). Une extraction protéique a été réalisée avant la stimulation et est nommée temps 0 (T0).

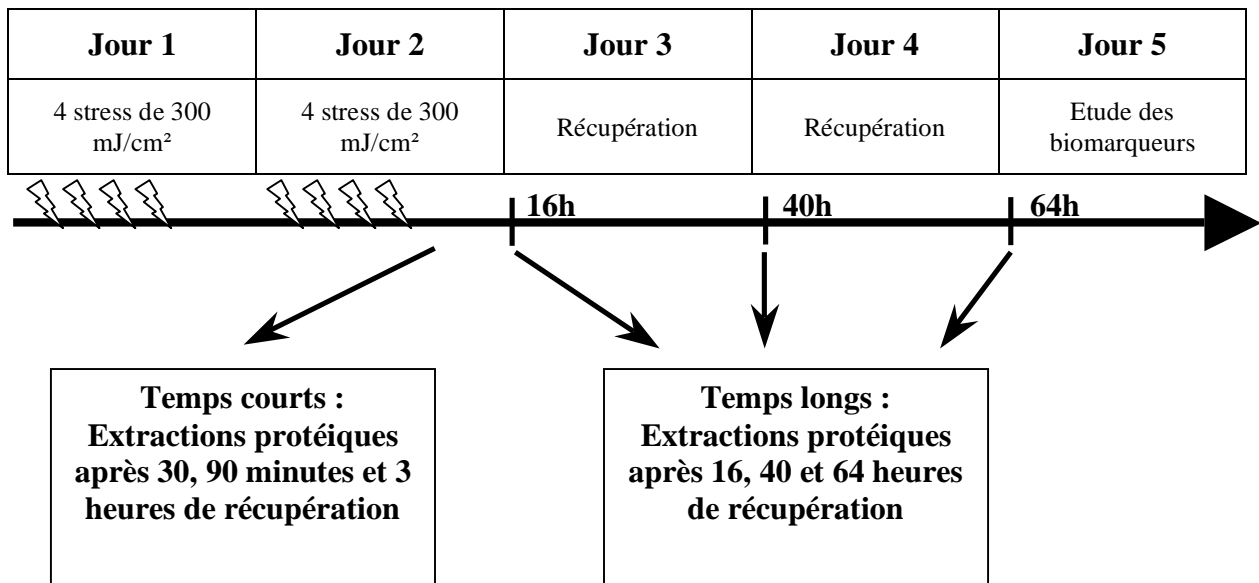


Figure 1 Modèle utilisé pour l'étude de l'abondance des protéines impliquées dans la réponse à long terme des kératinocytes exposés aux UV-B pendant la phase de récupération après les stress. Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales d'UV-B (300 mJ/cm² par stress), réparties en 4 fois par jour pendant deux jours. Les cellules contrôles sont traitées en parallèle mais en l'absence d'UV-B. Les extractions protéiques ont été réalisées avec le tampon DLA après 30, 90 minutes et 3 heures de récupération (temps dits courts) et après 16, 40 et 64 heures de récupération (temps dits longs).

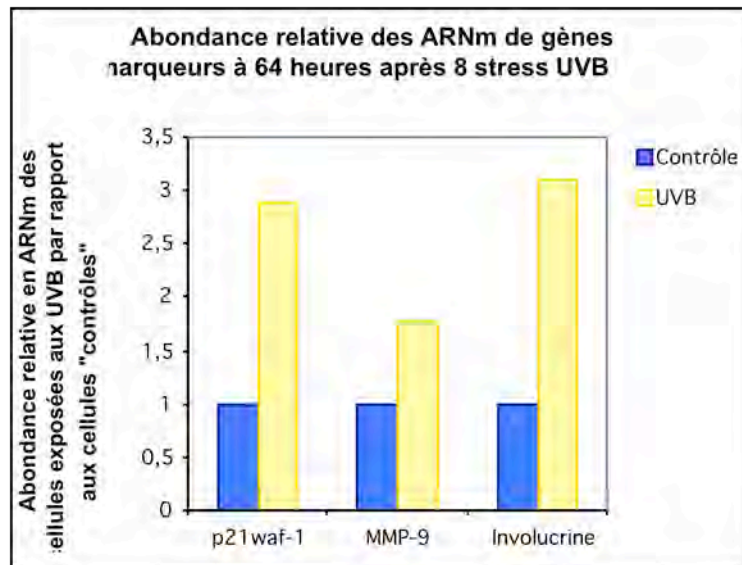


Figure 3a

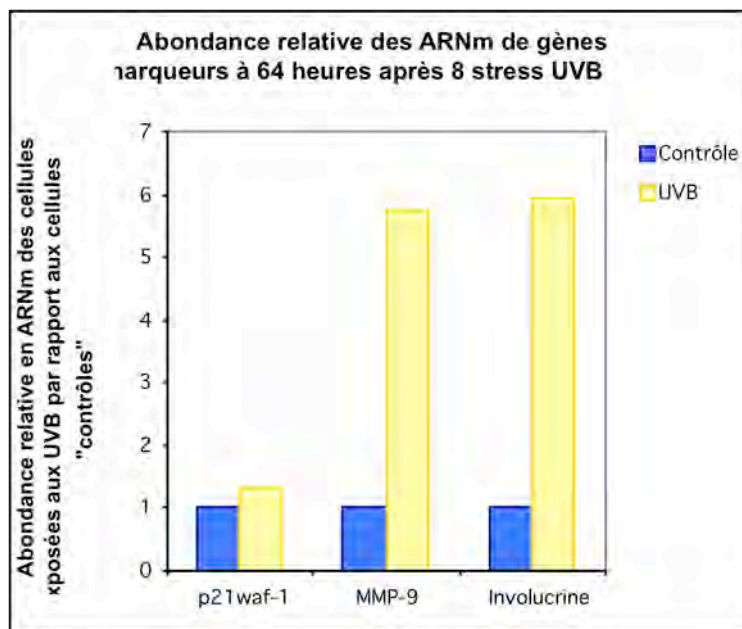


Figure 3b

Figure 3a et 3b Abondance relative de l'ARNm de p21^{Waf-1}, de MMP-9 et de l'involucrine chez les kératinocytes N-htert à 64 heures après une série de 8 expositions aux UV-B à raison de 300 mJ/cm² par exposition, lorsque les cellules "contrôles" n'étaient pas confluentes (**Figure 3a**) ou étaient confluentes (**Figure 3b**) au moment de l'extraction d'ARN.

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 stress sub-létaux d'UV-B répartis en 4 fois par jour pendant 2 jours. Une extraction d'ARNm a été réalisée après 64 heures de récupération. Les ADN complémentaires ont été retrotranscrits à partir de 2 µg d'ARN total puis sont amplifiés par une PCR en temps réel utilisant des amorces spécifiques des gènes p21^{Waf-1}, MMP-9 et l'involucrine. Le niveau d'ARNm de la GAPDH a été utilisé comme niveau de référence.

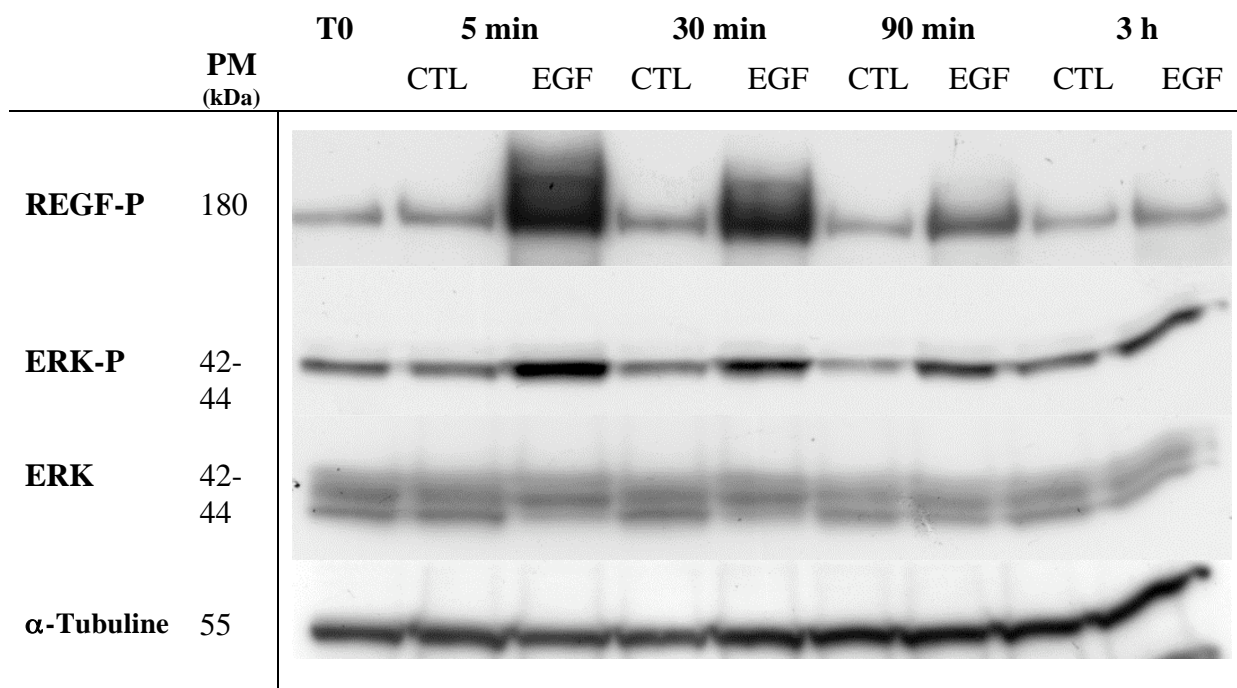


Figure 4 Phosphorylation du récepteur de l'EGF (REGF-P) et de ERK (ERK) chez les kératinocytes N-htert après une stimulation à l'EGF.

Afin d'activer le récepteur à l'EGF, une stimulation avec de l'EGF à une concentration finale de 10 ng/ml a été effectuée (EGF) sur des kératinocytes humains (N-htert). CTL correspond aux extraits protéiques provenant de cellules « contrôles » c'est-à-dire non stimulées avec de l'EGF. Ces protéines ont été extraites avec le tampon "Biosource" à 5, 30, 90 minutes et 3 heures après la stimulation. La forme phosphorylée sur la tyrosine 1173 du récepteur EGF est mise en évidence par Western blot, à partir de 20 μ g de protéines. La phosphorylation de la protéine ERK est également étudiée. L' α -tubuline est utilisée comme contrôle de charge afin de vérifier qu'une quantité similaire de protéine a été chargée dans chaque piste. Une extraction protéique a été réalisée avant la stimulation et est nommée temps 0 (T0).

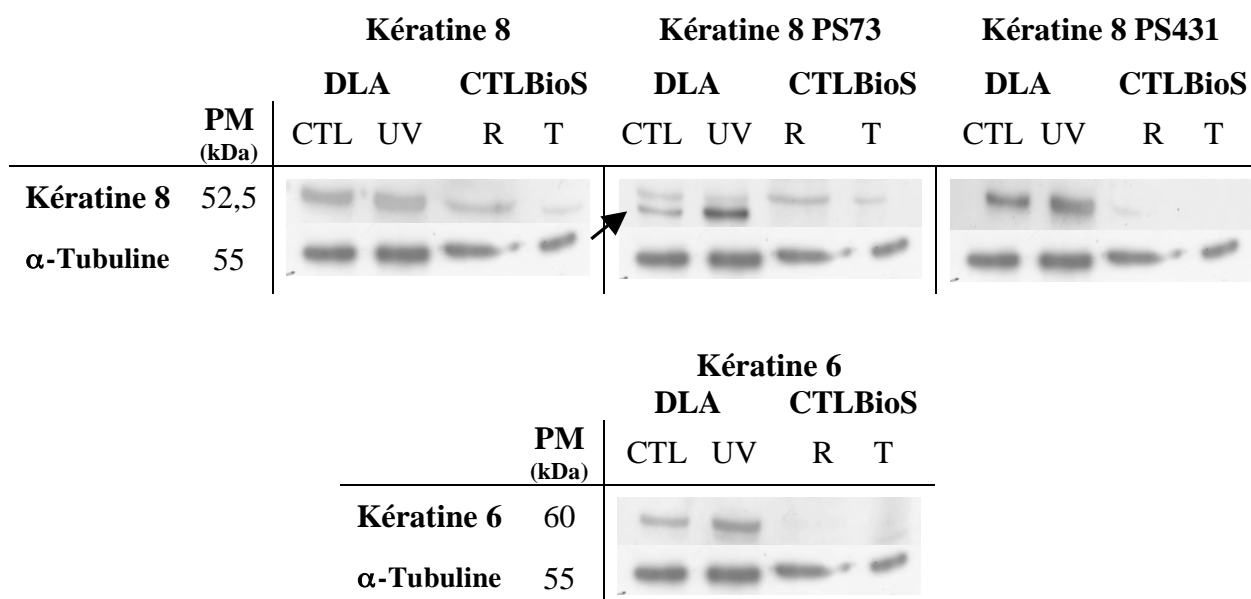


Figure 5 : Test 1 : Comparaison de deux tampons de lyse DLA (DLA) et Biosource (BioS) pour la détection par Western blot des kératines 6, 8 et des formes phosphorylées sur les sérines 73 et 431 de la kératine 8

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales de 300 mJ/cm² d'UV-B à raison de 4x/jour (UV). Les cellules "contrôles" (CTL) n'ont pas été exposés aux UV-B. Les échantillons (CTL) et (UV) ont été extraits avec le "DLA" et la technique de récupération est réalisée à l'aide de la trypsine. Deux techniques de récupération des cellules ont été testées avec le tampon "Biosource" (BioS) sur des cellules "contrôles" : racler (R) ou détacher à l'aide de la trypsine (T). Un Western blot a été réalisé à partir de 20 µg de protéines pour détecter les kératines 6, 8 et les deux formes phosphorylées de cette dernière. L' α -tubuline est utilisée comme contrôle de charge afin de vérifier qu'une quantité similaire de protéines a été chargée dans chaque piste. La flèche indique les bandes correspondantes à la kératine 8.

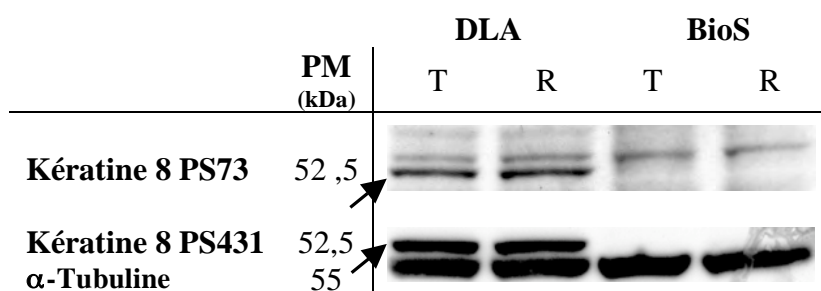


Figure 6 : Test 2 : Comparaison de deux méthodes de récupération des cellules et de deux tampons de lyse, tampon DLA (DLA) et tampon Biosource (BioS), pour la détection par Western blot des formes phosphorylées de la kératine 8 sur les sérines 73 et 431.

Pour chaque tampon, les cellules ont été soit raclées directement dans le tampon (R) soit détachées à l'aide de la trypsine, centrifugées puis lysées dans le tampon (T). Un Western blot mettant en évidence les deux types de phosphorylation de la kératine 8 a été réalisé à partir de 20 µg de protéines. L' α -tubuline est utilisée comme contrôle de charge afin de vérifier qu'une quantité similaire de protéines a été chargée sur chaque piste. Les flèches indiquent les bandes correspondantes aux formes phosphorylées de la kératine 8.

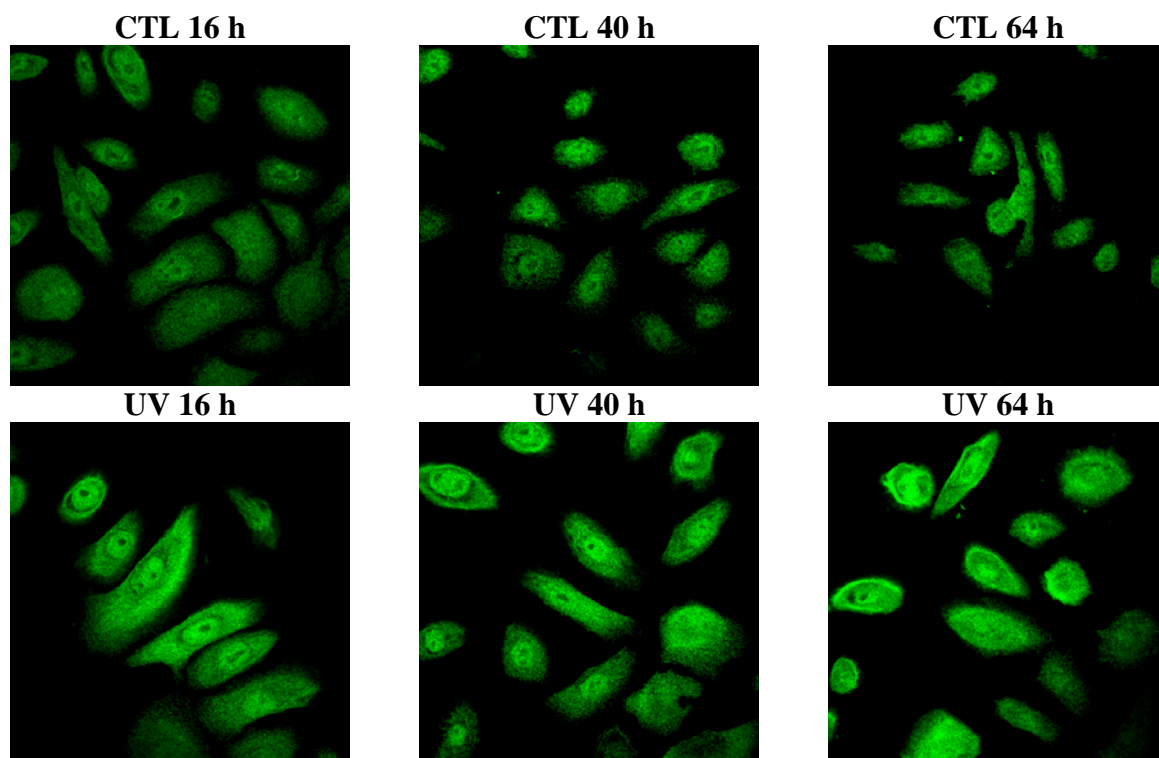


Figure 7a CapG

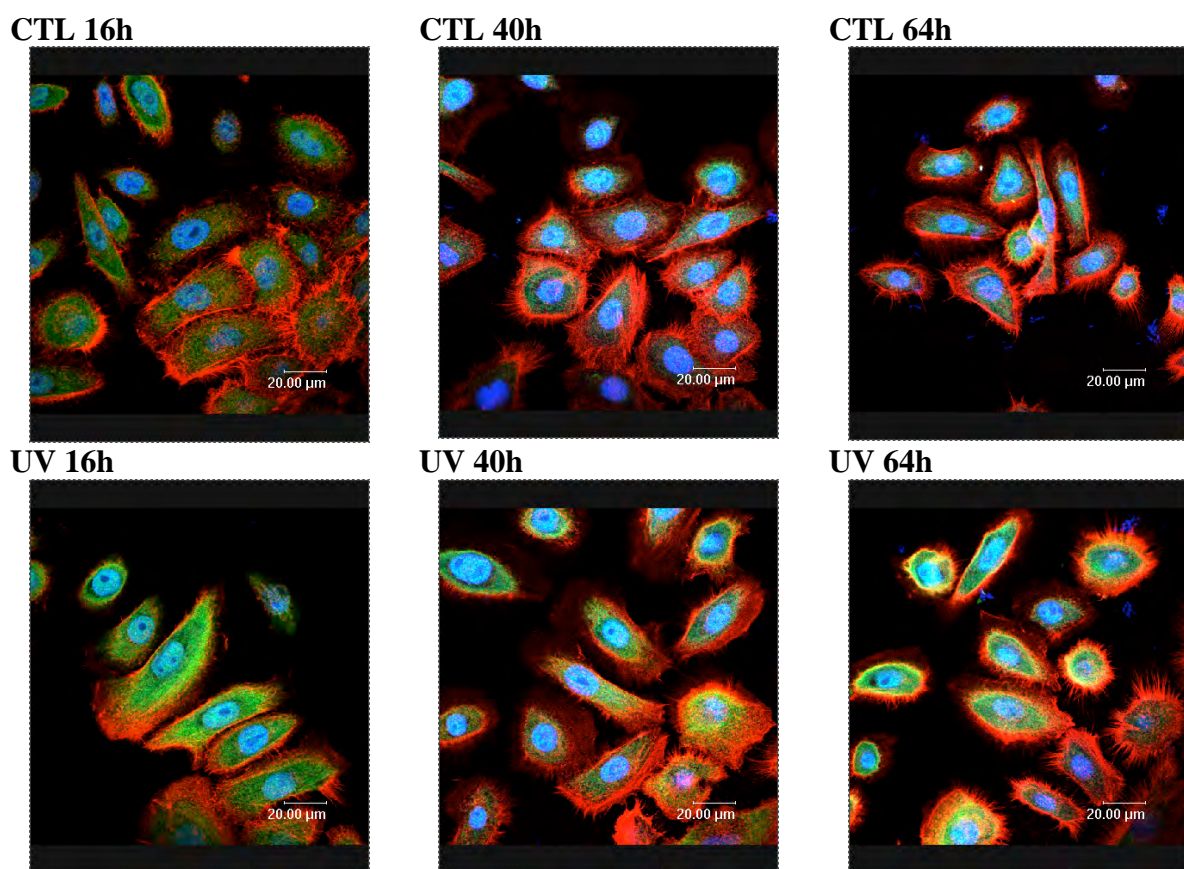


Figure 7b CapG et actine

Figure 7a et 7b Analyse par immunofluorescence du profil d'abondance et de la localisation cellulaire de CapG (**Figure 7a**) et de CapG en colocalisation avec l'actine (**Figure 7b**) au cours de la récupération des kératinocytes N-htert après huit expositions répétées aux UV-B. Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales d'UV-B (300 mJ/cm²), réparties en 4 fois par jour (UV). Les cellules « contrôles » (CTL) n'ont pas été exposées aux UV-B. La localisation cellulaire est étudiée à 16, 40 et 64 heures après le dernier stress (temps longs). Les cellules sont repiquées sur des lamelles la veille de l'immunofluorescence à raison de 20 000 cellules/puit. Ces cellules sont fixées par le paraformaldéhyde 3% et perméabilisées par le triton X-100. CapG est mise en évidence par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps spécifique marqué avec un fluorochrome émettant dans le vert. Dans la figure 7b, l'actine est détectée grâce à un fluorochrome émettant dans le rouge. Les images sont visualisées par microscopie confocale. Les noyaux sont colorés au TOPRO 3 qui apparaît en bleu.

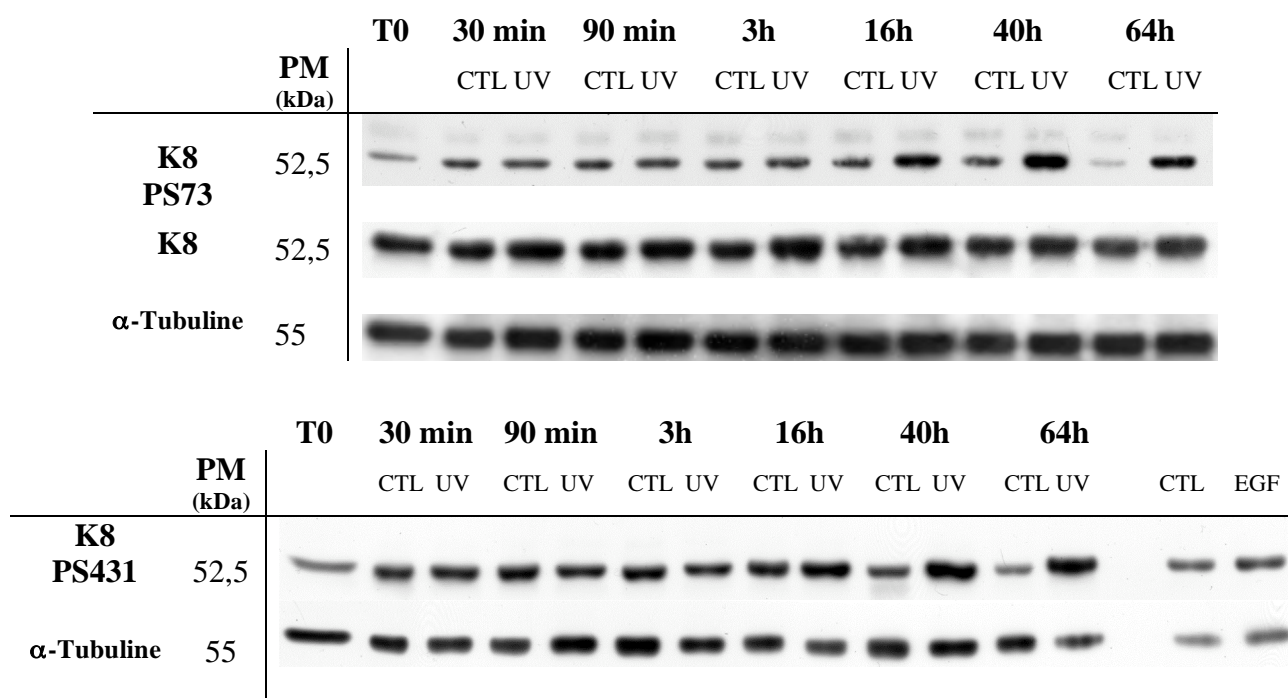


Figure 8 Analyse par Western blot du profil d'abondance de la kératine 8 (K8) et de ses formes phosphorylées sur les sérines 73 (K8PS73) et 431 (K8PS431) au cours de la récupération des kératinocytes N-htert après des expositions répétées aux UV-B.

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales de 300 mJ/cm² d'UV-B à raison de 4 fois par jour (UV). Les cellules "contrôles" (CTL) n'ont pas été exposées aux UV-B. Les extractions protéiques ont été réalisées à 30, 90 minutes et 3 heures après le dernier stress (temps courts), et après 16, 40 et 64 heures de récupération (temps longs). Ces extractions ont été réalisées avec le tampon "DLA". Un Western blot a été réalisé à partir de 30 µg de protéines pour détecter la kératines 8 et ses deux formes phosphorylées (sur les sérines 73 et 431). L'α-tubuline est utilisée comme contrôle de charge afin de vérifier qu'une quantité similaire de protéines a été chargée dans chaque piste. Une extraction protéique a été réalisée avant la première exposition, nommé temps 0 (T0). Pour la forme phosphorylée sur la sérine 431 de la kératine 8, la dernière piste correspond à la stimulation à l'EGF (10 ng/ml, 5 min) (EGF), constituant un contrôle positif de la voie activée par l'EGF. Les cellules "contrôles" de cette stimulation sont représentées par (CTL).

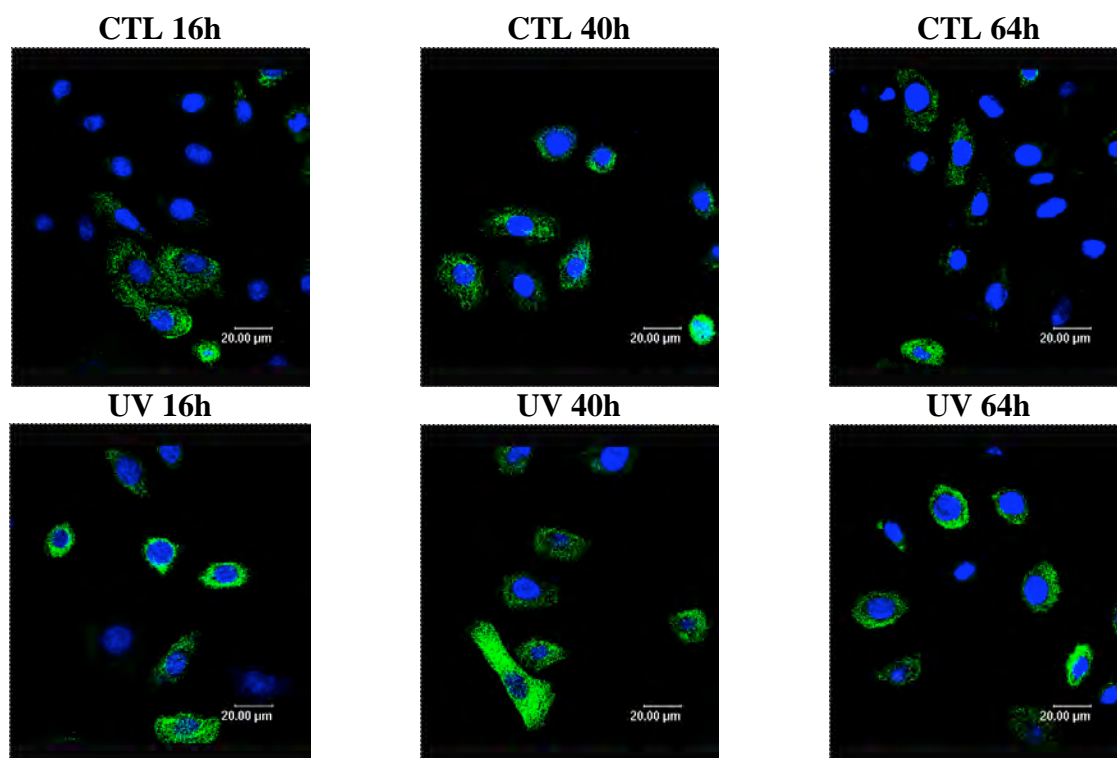


Figure 9 Analyse par immunofluorescence du profil d'abondance et de la localisation cellulaire de la kératine 8 au cours de la récupération des kératinocytes N-htert après des expositions répétées aux UV-B.

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales d'UV-B (300 mJ/cm^2), réparties en 4 fois par jour (UV). Les cellules « contrôles » (CTL) n'ont pas été exposées aux UV-B. La localisation cellulaire est étudiée à 16, 40 et 64 heures après le dernier stress (temps longs). Les cellules sont repiquées sur des lamelles la veille de l'immunofluorescence à raison de 20 000 cellules/puit et sont fixées par le paraformaldéhyde 3% et perméabilisées par le triton X-100. La kératine 8 est mise en évidence par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps spécifique marqué par un fluorochrome émettant dans le vert. Les images sont visualisées par microscopie confocale. Les noyaux sont colorés au TOPRO 3 qui apparaît en bleu.

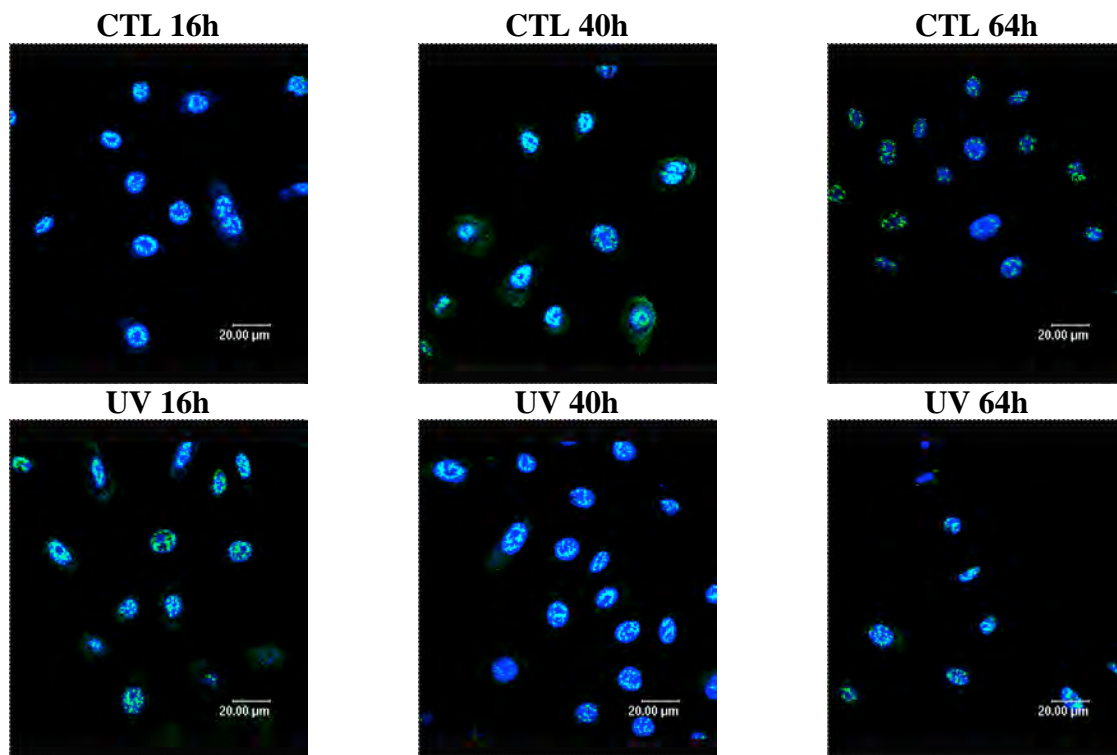


Figure 10a

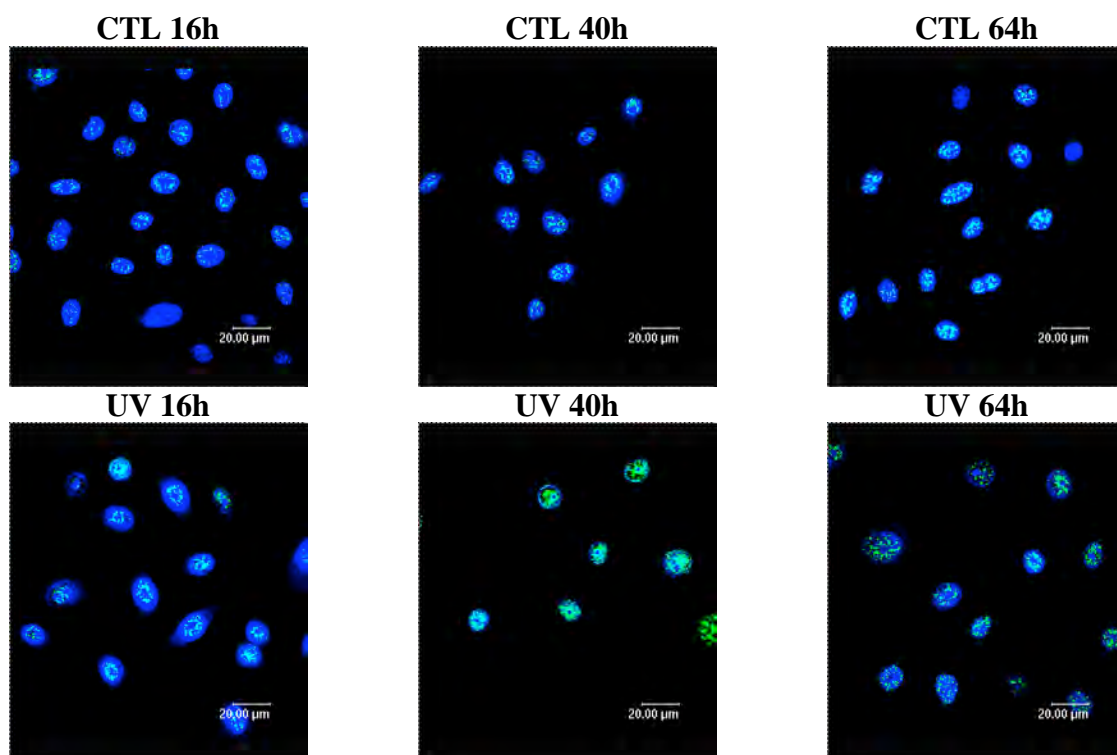


Figure 10b

Figure 10a et 10b Analyse par immunofluorescence du profil d'abondance et de la localisation cellulaire de la kératine 8 phosphorylée sur la sérine 73 au cours de la récupération des kératinocytes N-htert après des expositions répétées aux UV-B

Deux techniques de fixation/perméabilisation ont été utilisées : paraformaldéhyde et triton X-100 (**Figure 10a**) et acétone (**Figure 10b**).

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales d'UV-B (300 mJ/cm²), réparties en 4 fois par jour (UV). Les cellules « contrôles » (CTL) n'ont pas été exposées aux UV-B. La localisation cellulaire est étudiée à 16, 40 et 64 heures après le dernier stress (temps longs). Les cellules sont repiquées sur des lamelles la veille de l'immunofluorescence à raison de 20 000 cellules/puit et sont soit fixées par le paraformaldéhyde 3% et perméabilisées par le triton X-100, soit par l'acétone. La forme phosphorylée sur la sérine 73 de la kératine 8 est mise en évidence par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps spécifique marqué par un fluorochrome émettant dans le vert. Les images sont visualisées par microscopie confocale. Les noyaux sont colorés au TOPRO 3 qui apparaît en bleu.

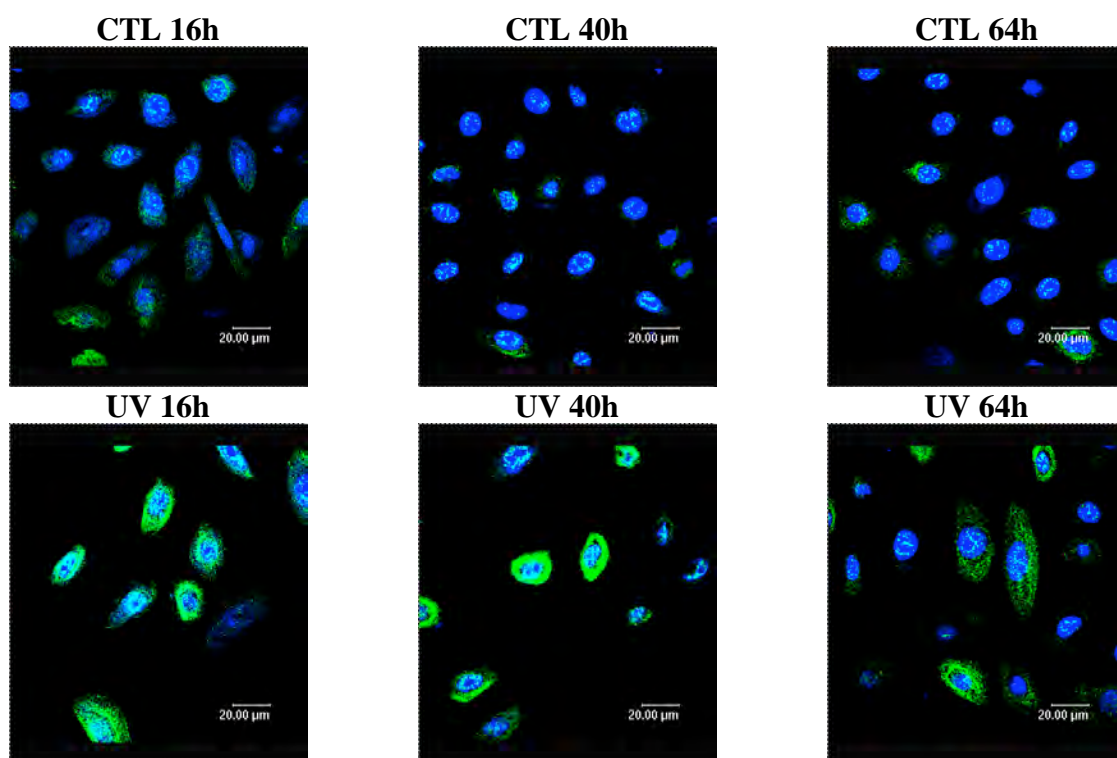


Figure 11a

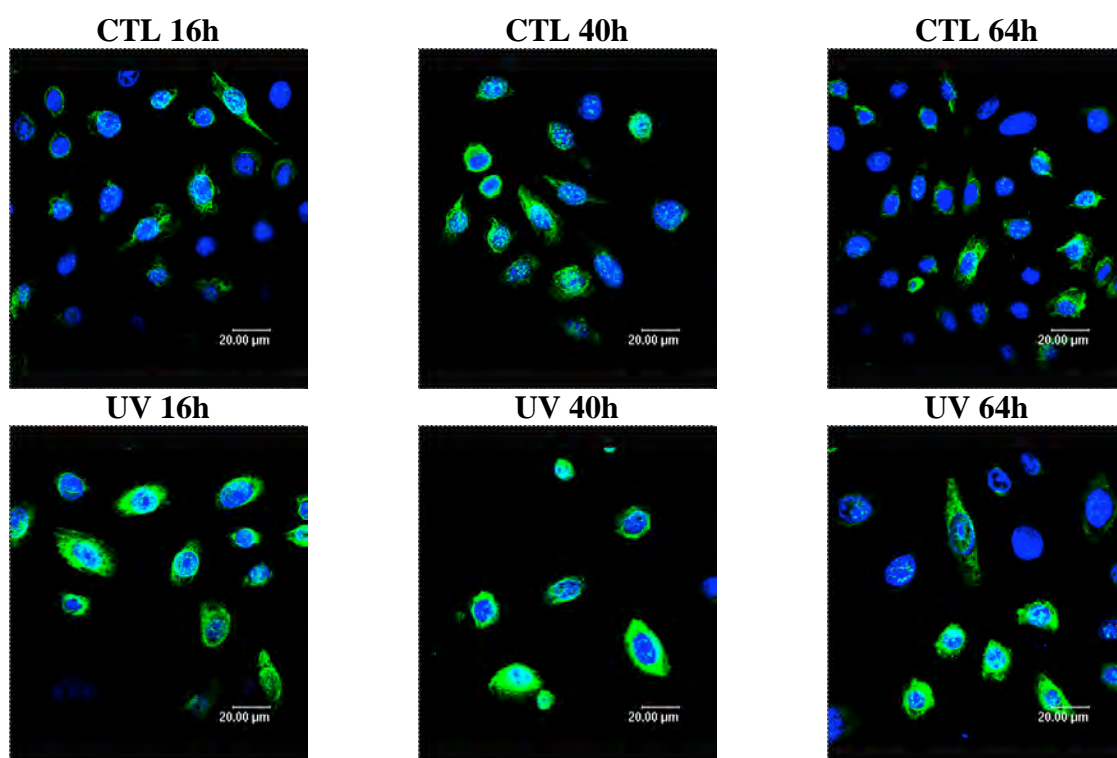


Figure 11b

Figure 11a et 11b Analyse par immunofluorescence du profil d'abondance et de la localisation cellulaire de la kératine 8 phosphorylée sur la sérine 431 au cours de la récupération des kératinocytes N-htert après des expositions répétées aux UV-B.

Deux techniques de fixation/perméabilisation ont été utilisées : paraformaldéhyde et triton X-100 (**Figure 11a**) et acétone (**Figure 11b**).

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales d'UV-B (300 mJ/cm²), réparties en 4 fois par jour (UV). Les cellules « contrôles » (CTL) n'ont pas été exposées aux UV-B. La localisation cellulaire est étudiée à 16, 40 et 64 heures après le dernier stress (temps longs). Les cellules sont repiquées sur des lamelles la veille de l'immunofluorescence à raison de 20 000 cellules/puit et sont soit fixées par le paraformaldéhyde 3% et perméabilisées par le triton X-100, soit par l'acétone. La forme phosphorylée sur la sérine 431 de la kératine 8 est mise en évidence par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps spécifique marqué par un fluorochrome émettant dans le vert. Les images sont visualisées par microscopie confocale. Les noyaux sont colorés au TOPRO 3 qui apparaît en bleu.

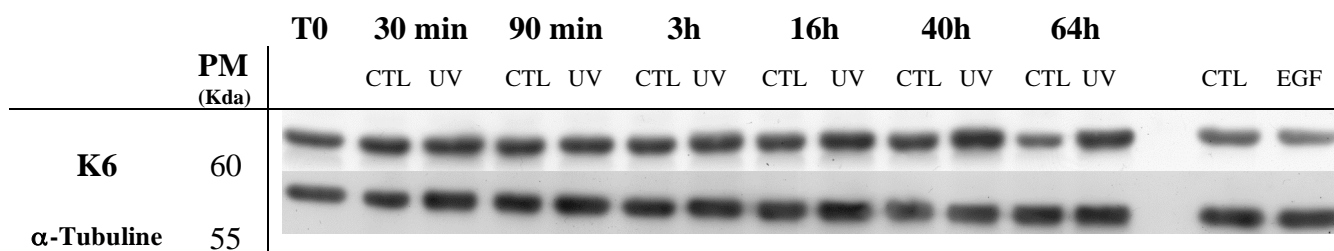


Figure 12 Analyse par Western blot du profil d'abondance de la kératine 6 au cours de la récupération des kératinocytes N-htert après des expositions répétées aux UV-B

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales de 300 mJ/cm² d'UV-B à raison de 4 fois par jour (UV). Les cellules "contrôles" (CTL) n'ont pas été exposées aux UV-B. Les extractions protéiques ont été réalisées à 30, 90 minutes et 3 heures après le dernier stress (temps courts), et après 16, 40 et 64 heures de récupération (temps longs). Ces extractions ont été réalisées avec le tampon "DLA". Un Western blot a été réalisé à partir de 30 µg de protéines pour détecter la kératines 6. L' α -tubuline est utilisée comme contrôle de charge afin de vérifier qu'une quantité similaire de protéines a été chargée dans chaque piste. Une extraction protéique a été réalisée avant la première exposition, nommé temps 0 (T0). La dernière piste correspond à la stimulation à l'EGF (10 ng/ml, 5 min) (EGF), constituant un contrôle positif de la voie activée par l'EGF. Les cellules "contrôles" de cette stimulation sont représentées par (CTL).

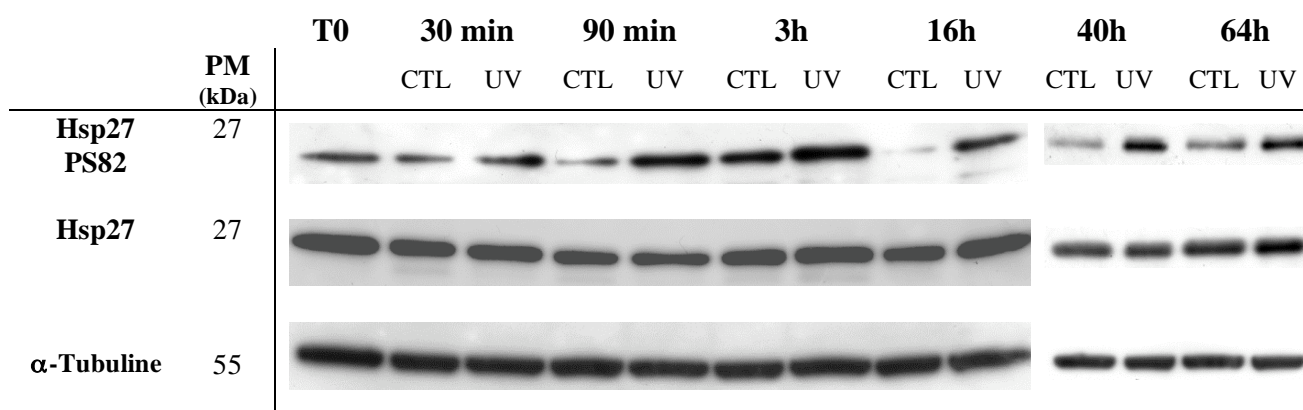


Figure 13 Analyse par Western blot du profil d'abondance de Hsp27 (Hsp27) et de sa forme phosphorylée sur la sérine 82 (Hsp27PS82) au cours de la récupération des kératinocytes N-tert après des expositions répétées aux UV-B.

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales de 300 mJ/cm² d'UV-B à raison de 4 fois par jour (UV). Les cellules "contrôles" (CTL) n'ont pas été exposées aux UV-B. Les extractions protéiques ont été réalisées à 30, 90 minutes et 3 heures après le dernier stress (temps courts), et après 16, 40 et 64 heures de récupération (temps longs). Ces extractions ont été réalisées avec le tampon "Biosource". Un Western blot a été réalisé à partir de 30 µg de protéines pour détecter Hsp27 et sa forme phosphorylée sur la sérine 82. L' α -tubuline est utilisée comme contrôle de charge afin de vérifier qu'une quantité similaire de protéines a été chargée dans chaque piste. Une extraction protéique a été réalisée avant la première exposition, nommée temps 0 (T0).

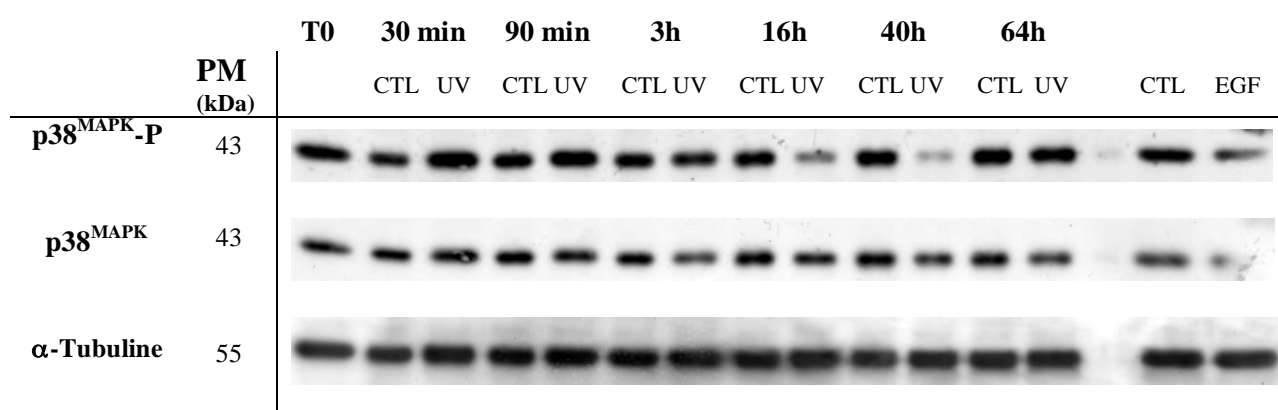


Figure 14 Analyse par Western blot du profil d'abondance de p38^{MAPK} (p38^{MAPK}) et de sa forme phosphorylée (p38^{MAPK}-P) au cours de la récupération des kératinocytes N-htert après des expositions répétées aux UV-B.

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales de 300 mJ/cm² d'UV-B à raison de 4 fois par jour (UV). Les cellules "contrôles" (CTL) n'ont pas été exposées aux UV-B. Les extractions protéiques ont été réalisées à 30, 90 minutes et 3 heures après le dernier stress (temps courts), et après 16, 40 et 64 heures de récupération (temps longs). Ces extractions ont été réalisées avec le tampon "DLA". Un Western blot a été réalisé à partir de 30 µg de protéines pour détecter p38^{MAPK} et sa forme phosphorylée. L'α-tubuline est utilisée comme contrôle de charge afin de vérifier qu'une quantité similaire de protéines a été chargée dans chaque piste. Une extraction protéique a été réalisée avant la première exposition, nommé temps 0 (T0). La dernière piste correspond à la stimulation à l'EGF (10 ng/ml, 5 min) (EGF), constituant un contrôle positif de la voie activée par l'EGF. Les cellules "contrôles" de cette stimulation sont représentées par (CTL).

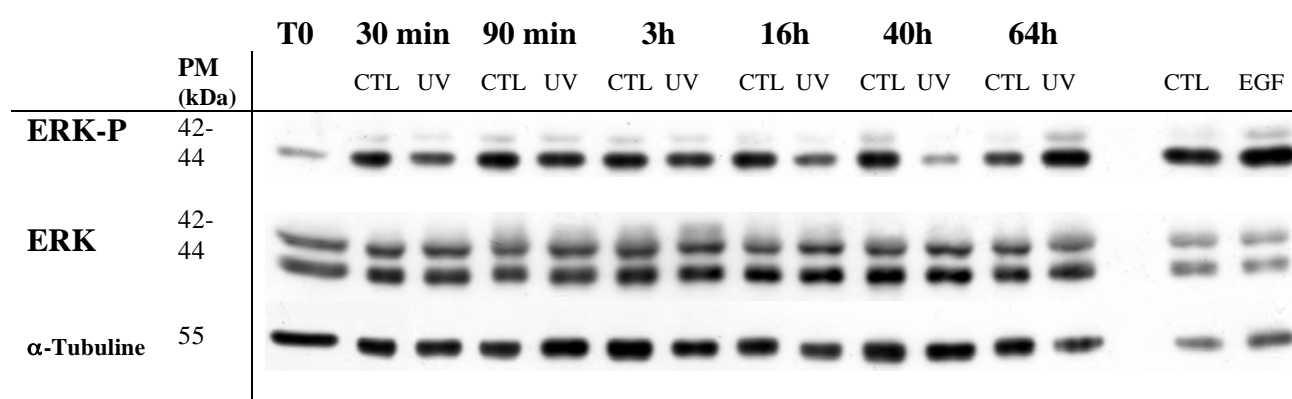


Figure 15 Analyse par Western blot du profil d'abondance de ERK (ERK) et de sa forme phosphorylée (ERK-P) au cours de la récupération des kératinocytes N-htert après des expositions répétées aux UV-B.

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales de 300 mJ/cm² d'UV-B à raison de 4 fois par jour (UV). Les cellules "contrôles" (CTL) n'ont pas été exposées aux UV-B. Les extractions protéiques ont été réalisées à 30, 90 minutes et 3 heures après le dernier stress (temps courts), et après 16, 40 et 64 heures de récupération (temps longs). Ces extractions ont été réalisées avec le tampon "DLA". Un Western blot a été réalisé à partir de 30 µg de protéines pour détecter ERK et sa forme phosphorylée. L'α-tubuline est utilisée comme contrôle de charge afin de vérifier qu'une quantité similaire de protéines a été chargée dans chaque piste. Une extraction protéique a été réalisée avant la

première exposition, nommé temps 0 (T0). La dernière piste correspond à la stimulation à l'EGF (10 ng/ml, 5 min) (EGF), constituant un contrôle positif de la voie activée par l'EGF. Les cellules "contrôles" de cette stimulation sont représentées par (CTL).

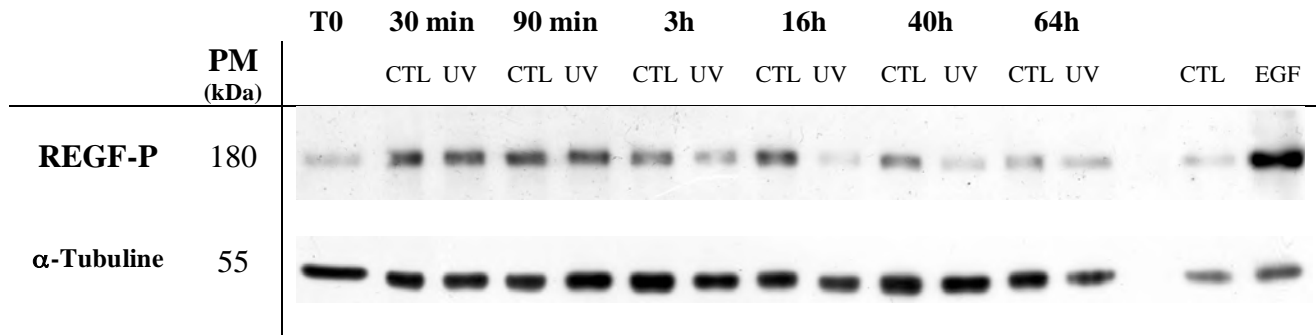


Figure 16 Analyse par Western blot du profil d'abondance de la forme phosphorylée du récepteur de l'EGF (REGF-P) au cours de la récupération des kératinocytes N-htert.

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales de 300 mJ/cm² d'UV-B à raison de 4 fois par jour (UV). Les cellules "contrôles" (CTL) n'ont pas été exposées aux UV-B. Les extractions protéiques ont été réalisées à 30, 90 minutes et 3 heures après le dernier stress (temps courts), et après 16, 40 et 64 heures de récupération (temps longs). Ces extractions ont été réalisées avec le tampon "DLA". Un Western blot a été réalisé à partir de 30 µg de protéines pour détecter la forme phosphorylée du récepteur de l'EGF. L'alpha tubuline est utilisée comme contrôle de charge afin de vérifier qu'une quantité similaire de protéines a été chargée dans chaque piste. Une extraction protéique a été réalisée avant la première exposition, nommé temps 0 (T0). La dernière piste correspond à la stimulation à l'EGF (10 ng/ml, 5 min) (EGF), constituant un contrôle positif de la voie activée par l'EGF. Les cellules "contrôles" de cette stimulation sont représentées par (CTL).

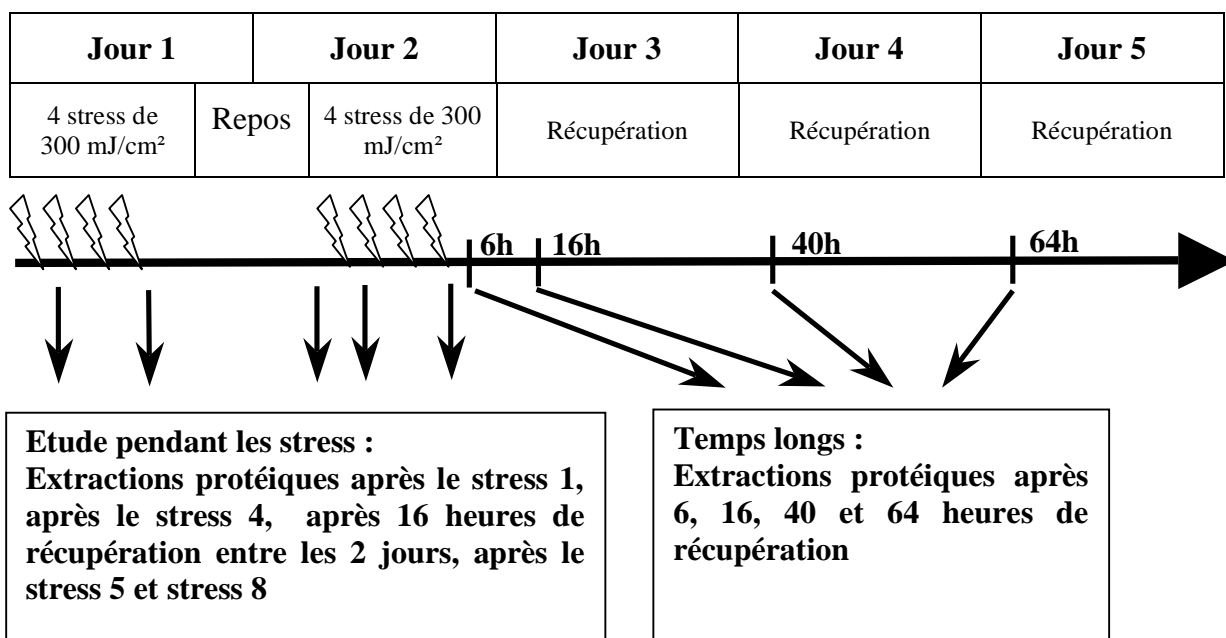


Figure 17 Modèle utilisé pour l'étude de l'abondance des protéines impliquées dans la réponse des kératinocytes exposés aux UV-B pendant les stress et pendant la récupération.

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses subcytotoxiques d'UV-B (300 mJ/cm²), réparties en 4 fois par jour pendant deux jours. Les cellules contrôles n'ont pas été exposées aux UV-B. Les extractions protéiques ont été réalisées pendant les stress : après le premier stress (Stress1), après le quatrième stress (Stress 4), après 16 heures de repos entre les deux jours de stress (Repos), après le cinquième stress (Stress 5), après le dernier stress (Stress 8), et pendant la récupération des cellules : après 6, 16, 40 et 64 heures de récupération.

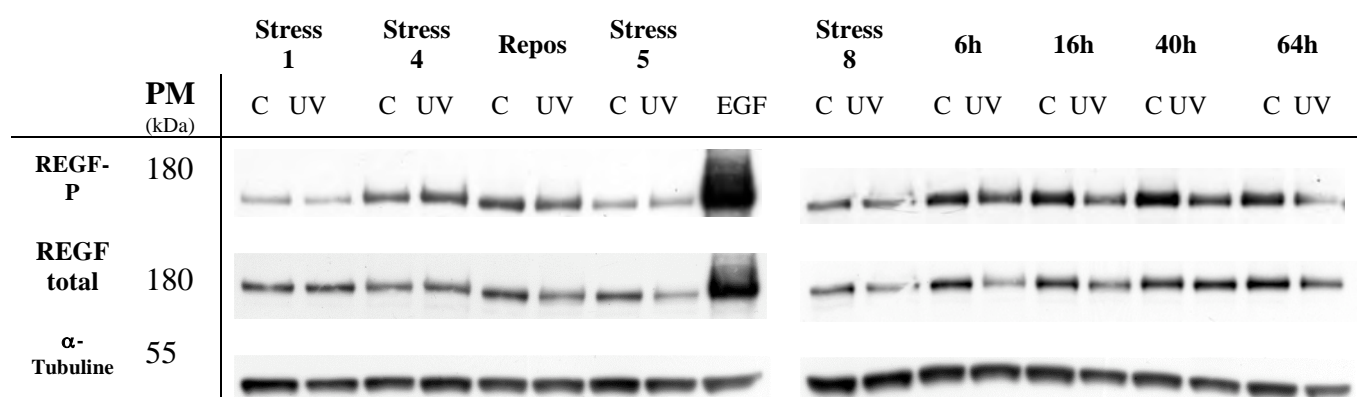


Figure 18 Analyse par Western blot du profil d'abondance du récepteur de l'EGF et de sa forme phosphorylée pendant les stress aux UV-B et au cours de la récupération des kératinocytes N-htert après des expositions répétées aux UV-B.

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales de 300 mJ/cm² d'UV-B à raison de 4 fois par jour (UV). Les cellules "contrôles" (C) n'ont pas été exposées aux UV-B. Les extractions protéiques ont été réalisées pendant les stress : après le premier stress (Stress1), après le quatrième stress (Stress 4), après 16 heures de repos entre les deux jours de stress (Repos), après le cinquième stress (Stress 5), après le dernier stress (Stress 8), et pendant la récupération des cellules : après 6, 16, 40 et 64 heures de récupération (temps longs). Ces extractions ont été réalisées avec le tampon "DLA". Un Western blot a été réalisé à partir de 30 µg de protéines pour détecter le récepteur de l'EGF et sa forme phosphorylée. L'α-tubuline est utilisée comme contrôle de charge afin de vérifier qu'une quantité similaire de protéines a été chargée dans chaque piste. La neuvième piste correspond à la stimulation à l'EGF (10 ng/ml, 5 min) (EGF), constituant un contrôle positif de la voie activée par l'EGF

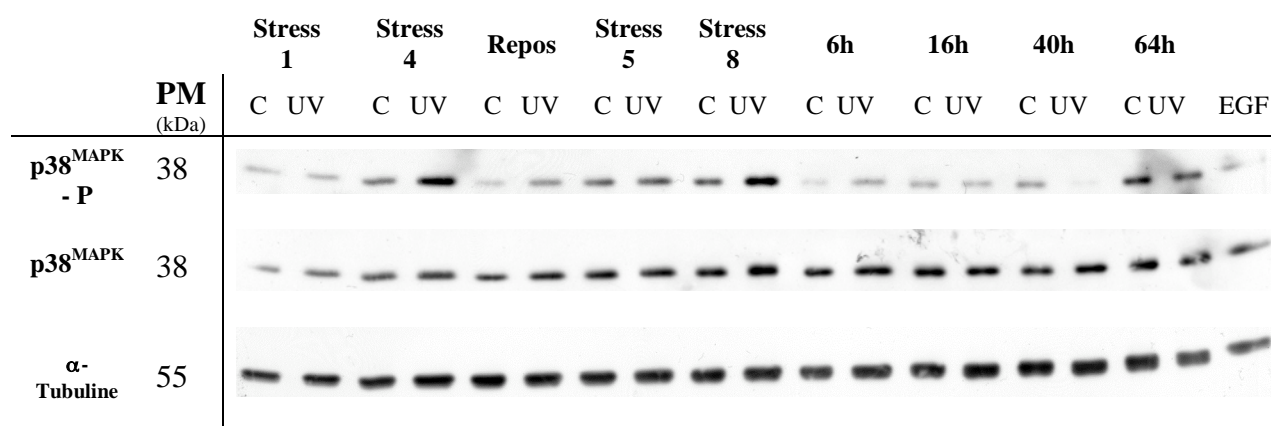


Figure 19 Analyse par Western blot du profil d'abondance de p38^{MAPK} et de sa forme phosphorylée pendant les stress aux UV-B et au cours de la récupération des kératinocytes N-htert après des expositions répétées aux UV-B.

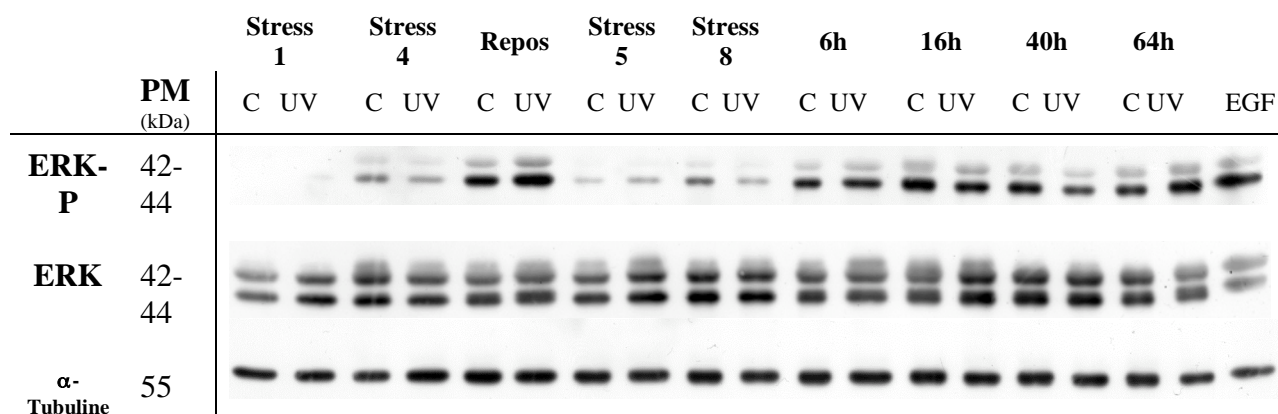


Figure 20 Analyse par Western blot du profil d'abondance de la ERK et de sa forme phosphorylée pendant les stress aux UV-B et au cours de la récupération des kératinocytes N-htert après des expositions répétées aux UV-B.

Figure 19 et 20 Analyse par Western blot du profil d'abondance de p38^{MAPK} et de sa forme phosphorylée (**Figure 19**) et du profil d'abondance de ERK et de sa forme phosphorylée (**Figure 20**) pendant les stress aux UV-B et au cours de la récupération des kératinocytes N-htert après des expositions répétées aux UV-B.

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales de 300 mJ/cm² d'UV-B à raison de 4 fois par jour (UV). Les cellules "contrôles" (C) n'ont pas été exposées aux UV-B. Les extractions protéiques ont été réalisées pendant les stress : après le premier stress (Stress1), après le quatrième stress (Stress 4), après 16 heures de repos entre les deux jours de stress (Repos), après le cinquième stress (Stress 5), après le dernier stress (Stress 8), et pendant la récupération des cellules : après 6, 16, 40 et 64 heures de récupération (temps longs). Ces extractions ont été réalisées avec le tampon "DLA". Un Western blot a été réalisé à partir de 30 µg de protéines pour détecter p38^{MAPK}, la forme phosphorylée de p38^{MAPK}, ERK et la forme phosphorylée de ERK. L'α-tubuline est utilisée comme contrôle de charge afin de vérifier qu'une quantité similaire de protéines a été chargée dans chaque piste. La dernière piste correspond à la stimulation à l'EGF (10 ng/ml, 5 min) (EGF), constituant un contrôle positif de la voie activée par l'EGF.

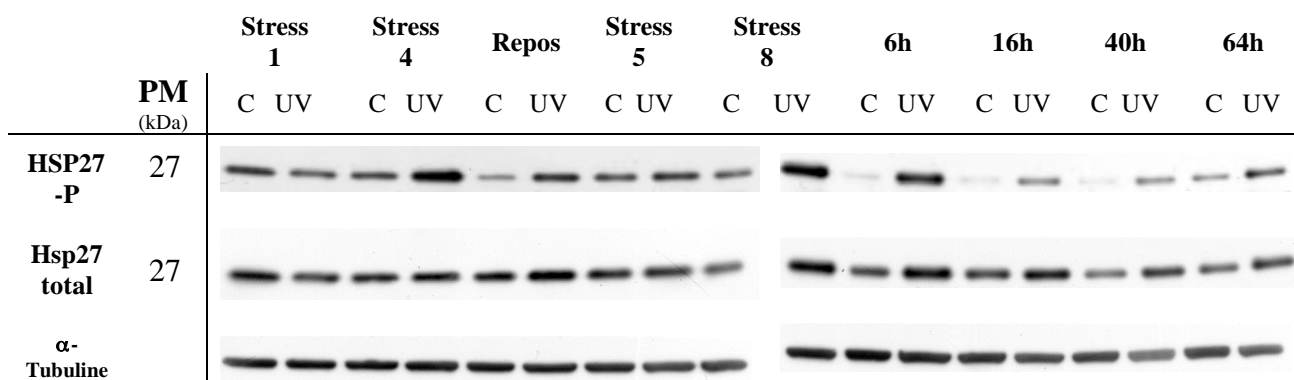


Figure 21 Analyse par Western blot du profil d'abondance de Hsp27 et de sa forme phosphorylée sur la sérine 82 pendant les stress aux UV-B et au cours de la récupération des kératinocytes N-htert après des expositions répétées aux UV-B.

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales de 300 mJ/cm² d'UV-B à raison de 4 fois par jour (UV). Les cellules "contrôles" (C) n'ont pas été exposées aux UV-B. Les extractions protéiques ont été réalisées pendant les stress : après le premier stress (Stress1), après le quatrième stress (Stress 4), après 16 heures de repos entre les deux jours de stress (Repos), après le cinquième stress (Stress 5), après le dernier stress (Stress 8), et pendant la récupération des cellules : après 6, 16, 40 et 64 heures de récupération (temps longs). Ces extractions ont été réalisées avec le tampon "DLA". Un Western blot a été réalisé à partir de 30 µg de protéines pour détecter Hsp27 et sa forme phosphorylée sur la sérine 82. L'α-tubuline est utilisée comme contrôle de charge afin de vérifier qu'une quantité similaire de protéines a été chargée dans chaque piste.

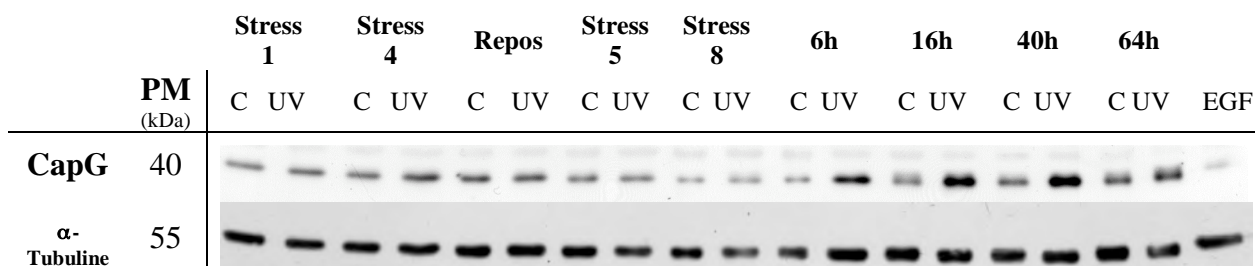


Figure 22 Analyse par Western blot du profil d'abondance de CapG pendant les stress aux UV-B et au cours de la récupération des kératinocytes après des expositions répétées aux UV-B.

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales de 300 mJ/cm² d'UV-B à raison de 4 fois par jour (UV). Les cellules "contrôles" (C) n'ont pas été exposées aux UV-B. Les extractions protéiques ont été réalisées pendant les stress : après le premier stress (Stress1), après le quatrième stress (Stress 4), après 16 heures de repos entre les deux jours de stress (Repos), après le cinquième stress (Stress 5), après le dernier stress (Stress 8), et pendant la récupération des cellules : après 6, 16, 40 et 64 heures de récupération (temps longs). Ces extractions ont été réalisées avec le tampon "DLA". Un Western blot a été réalisé à partir de 30 µg de protéines pour détecter CapG. L'α-tubuline est utilisée comme contrôle de charge afin de vérifier qu'une quantité similaire de protéines a été chargée dans chaque piste. La dernière piste correspond à la stimulation à l'EGF (10 ng/ml, 5 min) (EGF), constituant un contrôle positif de la voie activée par l'EGF.

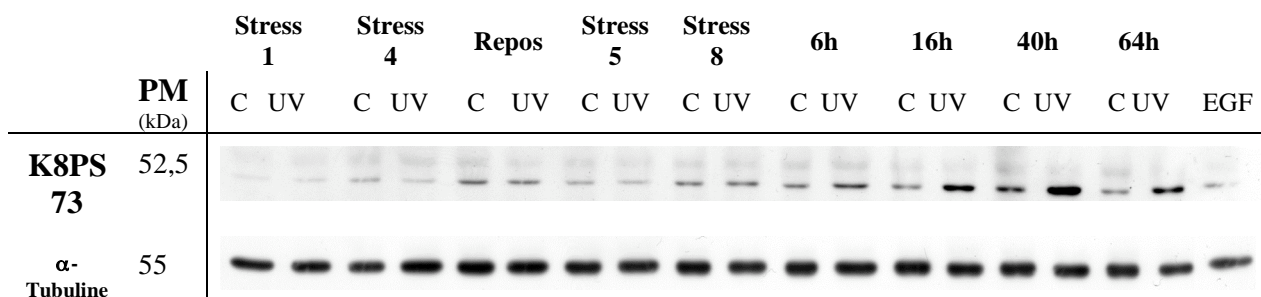


Figure 23 Analyse par Western blot du profil d'abondance de la forme phosphorylée sur la sérine 73 de la kératine 8 pendant les stress aux UV-B et au cours de la récupération des kératinocytes N-htert après des expositions répétées aux UV-B.

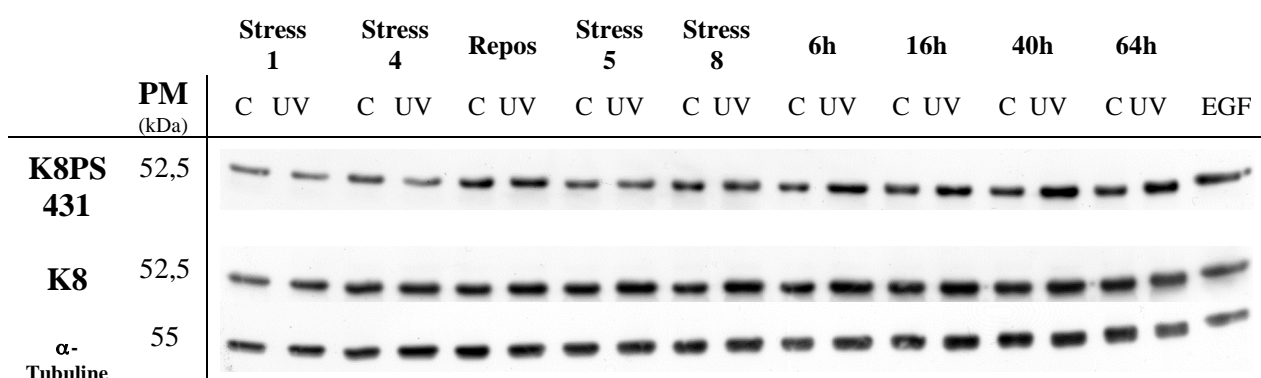


Figure 24 Analyse par Western blot du profil d'abondance de la kératine 8 (K8) et de sa forme phosphorylée sur la sérine 431 (K8PS431) pendant les stress aux UV-B et au cours de la récupération des kératinocytes après des expositions répétées aux UV-B.

Figure 23, 24 Analyse par Western blot du profil d'abondance de la kératine 8 (**Figure 24**), de sa forme phosphorylée sur la sérine 73 (**Figure 23**), de celle phosphorylée sur la sérine 431 (**Figure 24**) pendant les stress et au cours de la récupération des kératinocytes N-htert après des expositions répétées aux UV-B.

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales de 300 mJ/cm² d'UV-B à raison de 4 fois par jour (UV). Les cellules "contrôles" (C) n'ont pas été exposées aux UV-B. Les extractions protéiques ont été réalisées pendant les stress : après le premier stress (Stress1), après le quatrième stress (Stress 4), après 16 heures de repos entre les deux jours de stress (Repos), après le cinquième stress (Stress 5), après le dernier stress (Stress 8), et pendant la récupération des cellules : après 6, 16, 40 et 64 heures de récupération (temps longs). Ces extractions ont été réalisées avec le tampon "DLA". Un Western blot a été réalisé à partir de 30 µg de protéines pour détecter la kératine 8 et ses deux formes phosphorylées. L'α-tubuline est utilisée comme contrôle de charge afin de vérifier qu'une quantité similaire de protéines a été chargée dans chaque piste. La dernière piste correspond à la stimulation à l'EGF (10 ng/ml, 5 min) (EGF), constituant un contrôle positif de la voie activée par l'EGF.

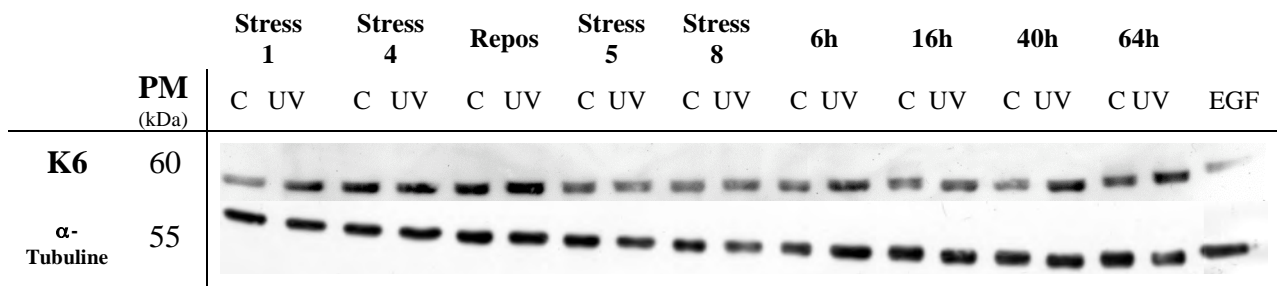


Figure 25 Analyse par Western blot du profil d'abondance de la kératine 6 pendant les stress aux UV-B et au cours de la récupération des kératinocytes N-htert après des expositions répétées aux UV-B.

Les kératinocytes N-htert ont été exposés à 8 doses sub-létales de 300 mJ/cm² d'UV-B à raison de 4 fois par jour (UV). Les cellules "contrôles" (C) n'ont pas été exposées aux UV-B. Les extractions protéiques ont été réalisées pendant les stress : après le premier stress (Stress1), après le quatrième stress (Stress 4), après 16 heures de repos entre les deux jours de stress (Repos), après le cinquième stress (Stress 5), après le dernier stress (Stress 8), et pendant la récupération des cellules : après 6, 16, 40 et 64 heures de récupération (temps longs). Ces extractions ont été réalisées avec le tampon "DLA". Un Western blot a été réalisé à partir de 30 µg de protéines pour détecter la kératine 6. L'α-tubuline est utilisée comme contrôle de charge afin de vérifier qu'une quantité similaire de protéines a été chargée dans chaque piste. La dernière piste correspond à la stimulation à l'EGF (10 ng/ml, 5 min) (EGF), constituant un contrôle positif de la voie activée par l'EGF.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

1 Conclusions et perspectives

L'objectif de ce projet était de caractériser la réponse à long terme des kératinocytes N-htert selon un modèle d'exposition de doses répétées et sub-létales d'UV-B, composé de huit expositions réparties en quatre par jour, pendant deux jours. Préalablement à ce travail, une étude protéomique par gels 2D a été menée au laboratoire et a mis en évidence des protéines dont l'abondance était différente chez les cellules exposées aux UV-B après 16, 40 et 64 heures de récupération. Parmi les protéines plus abondantes chez les cellules exposées aux UV-B, CapG, la kératine 8 ou 6 et Hsp27 ont été étudiées au cours de ce mémoire. Pour rappel, deux formes phosphorylées de la kératine 8, sur les sérines 73 et 431, et celle de Hsp27 sur la sérine 82 ont également été étudiées.

Le premier objectif de ce mémoire était de déterminer l'évolution de l'abondance des protéines CapG, K8, K6, HSP27 et éventuellement leurs formes phosphorylées, pendant la récupération qui suit huit expositions d'intensité sub-létale d'UV-B.

Le deuxième objectif était d'analyser les voies de signalisation situées en amont avec comme hypothèses un rôle éventuel du récepteur de l'EGF et/ou de la voie des MAPK.

Pour atteindre ces deux objectifs, nous avons donc voulu suivre les variations d'abondance des phosphorylations du récepteur de l'EGF, des MAPK et de nos protéines d'intérêt tout au long de la récupération des cellules après les expositions aux UVB : avec des temps dits « courts » (30, 90 min et 3h après le dernier stress) et des temps dits « longs » (16, 40 et 64 heures après le dernier stress). Certains résultats obtenus, ainsi que la littérature, nous ont ensuite poussés à analyser les profils d'abondance entre les stress.

1.1 Le récepteur de l'EGF

Nous nous attendions à observer une forte induction de la forme phosphorylée du récepteur de l'EGF lorsque les cellules ont été exposées aux UV-B, ce que nous n'observons pas même après les premiers stress. Pourtant, plusieurs équipes ont montré cette induction mais après un seul stress (Wang, Turlington et al. 2005) (Peus, Vasa et al. 1999).

Même si nous n'avons pas réussi à mettre en évidence le rôle du récepteur de l'EGF dans le phénotype observé, ceci ne signifie pas que ce rôle n'existe pas. D'une part, il serait intéressant de tester les autres sites de phosphorylation du récepteur de l'EGF. En effet, il est possible que le site de phosphorylation varie en fonction du stimulus qui a activé le récepteur. D'autre part, nous pourrions bloquer l'activation du récepteur à l'EGF à l'aide d'inhibiteurs spécifiques avant d'exposer les kératinocytes N-htert aux UV-B.

1.2 p38^{MAPK}

1.2.1 Lien potentiel entre p38^{MAPK} et Hsp27

Nous avons montré que p38^{MAPK} était phosphorylée avant que Hsp27 le soit dans les cellules exposées aux UV-B et cela, directement après le quatrième, le huitième stress et dans les temps courts de 30 et 90 minutes de récupération. Ensuite, la forme phosphorylée de Hsp27 persiste dans les cellules exposées aux UV-B pendant toute la phase de récupération après les expositions aux UV-B. Il est probable que la phosphorylation de Hsp27 soit déclenchée par

p38^{MAPK} car cette cascade d'activation a été mise en évidence dans d'autres études (Guay, Lambert et al. 1997). Il a été montré que de nombreux facteurs de stress peuvent provoquer la phosphorylation de Hsp27 (Nozaki, Takehana et al. 1997).

Hsp27 est une protéine impliquée dans la défense des cellules face aux stress. Nous pourrions peut-être trouver une résistance accrue des cellules face aux UV-B ou à d'autres stress lorsque cette protéine est surexprimée, ou lorsque l'abondance de la forme phosphorylée de Hsp27 est élevée suite à un stress aux UV-B préalable.

1.3 CapG, la kératine 8, ses deux types de phosphorylation et la kératine 6

Nous avons montré de façon reproductible que l'abondance de CapG, de la kératine 8, de ses deux types de phosphorylation et de la kératine 6 évoluent de la même façon essentiellement à partir de 16 heures de la récupération qui suit les huit expositions d'intensité sub-létale d'UV-B. Néanmoins, aucune d'entre elles ne semble varier en abondance entre les stress, ni lors des temps de récupération les plus courts. De plus, nous avons observé par immunofluorescence que CapG forme un anneau à la périphérie cellulaire dans les cellules exposées aux UV-B.

Le fait de ne pas avoir de modification parallèle du niveau de la phosphorylation de p38^{MAPK} et l'augmentation de l'abondance de CapG, de la kératine 8, de ses deux types de phosphorylation et de la kératine 6 ne veut pas dire qu'il n'y a pas de lien entre p38^{MAPK} et ces protéines. En effet, la forme phosphorylée de p38^{MAPK} pourrait peut-être à long terme engendrer une cascade de changements.

1.3.1 CapG

Classiquement, la concentration en calcium et les phospho-inositides coordonnent la dynamique du cytosquelette de l'actine suite à l'activation de la PLC (Phospho-lipase C) par des stimuli extérieurs. D'une part la libération de calcium active les protéines de la famille des gelsolines (CapG). D'autre part, la libération du DAG (Diacylglycérol) active plusieurs formes de PKC (Phospho-Kinase C) aboutissant à un remodelage du cytosquelette (Way, Chou et al. 2000). De leur côté, les phosphoinositides produits par la PI3 kinase (Phosphatidylinositol-3 Kinase) favorisent en général l'assemblage et la réticulation des filaments d'actine au niveau du cytosquelette par le recrutement à la membrane plasmique des protéines parmi lesquelles les protéines de coiffe, ce qui rejoint la localisation observée de CapG à la périphérie dans les cellules exposées aux UV-B (Kwiatkowski 1999).

Néanmoins, d'autres voies de transduction impliquées dans l'induction de CapG ont déjà été suggérées. A ce propos, une étude de Bahassi et al. a montré que CapG était une cible d'AP-1. D'autres études ont aussi mis en évidence que CapG pouvait être phosphorylée de façon dépendante de la voie PKC (Heck, Gerecke et al. 2004), PI3K ou encore via P38^{MAPK} (De Corte, Van Impe et al. 2004).

PKC est d'ailleurs fréquemment impliquée dans les réponses aux UV-B. Les UV-B activeraient PKC ce qui aboutirait entre autres à l'activation du facteur de transcription AP-1 (Heck, Gerecke et al. 2004). A ce propos, il est intéressant de souligner l'importance de PKC et du facteur de transcription AP-1 dans la régulation de gènes impliqués dans la différenciation des kératinocytes (Eckert, Crish et al. 1997).

Par ailleurs, une activation de la PI3 kinase par les UV a été décrite. Cette dernière entraînerait l'activation de AKT qui elle-même favoriserait la survie cellulaire après exposition (Wang, Quan et al. 2003) (Iordanov, Choi et al. 2002). Ces 2 voies (PKC et

PI3kinase) pourraient être impliquées dans la transduction du signal menant à l'induction de CapG et des autres protéines d'intérêt.

Une réorganisation du cytosquelette peut être impliquée dans la morphologie cellulaire, dans la migration des cellules, dans l'élaboration d'une protection contre des agents stressants (Rivero, Koppel et al. 1996). Il est intéressant de remarquer que nous avons mis en évidence un changement morphologique à 16 heures après le dernier stress et qui s'accroît tout au long de la récupération cellulaire, chez les cellules qui ont été exposées aux UV-B. Par exemple, CapG est impliqué dans la réorganisation du cytosquelette de l'actine (Silacci, Mazzolai et al. 2004), les phosphorylations des kératines influencent leur solubilisation ce qui peut entraîner une réorganisation du réseau des kératines, etc. Nous pourrions donc avoir différents processus qui mènent à la réorganisation complète du cytosquelette.

Le rôle de CapG dans la migration cellulaire a été démontré dans plusieurs types cellulaires : lors de la migration et de la phagocytose chez les macrophages (Witke, Li et al. 2001), chez des fibroblastes (Sun, Kwiatkowska et al. 1995) et dans les cellules endothéliales soumises à des stress de cisaillements (Pellieux, Desgeorges et al. 2003). De Corte a montré que CapG pouvait être phosphorylée et migrer dans le noyau. Ceci aurait pour conséquence de faciliter la progression et l'invasion des tumeurs en impliquant des métalloprotéases parmi lesquelles on retrouve MMP-2 et MMP-9 (De Corte, Van Impe et al. 2004).

CapG pourrait jouer un rôle protecteur chez les cellules endothéliales soumises aux stress de cisaillement (Pellieux, Desgeorges et al. 2003). Nous pourrions inhiber l'expression de CapG avant d'exposer les cellules aux UV-B et voir s'il y a des effets au niveau de l'actine. La surexpression de CapG dans les kératinocytes pourrait nous renseigner sur le rôle éventuel de CapG dans la mobilité cellulaire et dans le processus de migration. Nous pourrions par exemple surexprimer CapG par transfection et pour déterminer leur capacité de se mouvoir. Nous pourrions peut-être également réaliser cette expérience en utilisant des cellules qui ont été exposées aux UV-B.

1.3.2. Les kératines 6 , 8 et ses phosphorylations

La phosphorylation de la kératine 8, l'augmentation d'abondance de la kératine 8 et de la kératine 6 pourraient jouer un rôle dans la réorganisation du cytosquelette entraînant des changements morphologiques et un accroissement de la mobilité cellulaire (Bousquet and Coulombe 2002).

L'induction de la kératine 6 est associée à des maladies cutanées liées à une hyperprolifération ou à une différenciation anormale de la peau. Les kératines 6, 16 et 17 permettraient la coordination entre l'activation, la prolifération et la migration des cellules en leur apportant une certaine plasticité en formant un réseau supra-cellulaire. Ces kératines ont donc un rôle beaucoup plus subtil qu'un simple rôle structural en interagissant avec d'autres protéines impliquées dans les voies de signalisation, de la migration mais également des protéines du cycle cellulaire. Il a d'ailleurs été suggéré un rôle de la kératine 6 dans la voie de signalisation du récepteur de l'EGF (Bousquet and Coulombe 2002).

La phosphorylation des kératines est une modification post-traductionnelle majeure des kératines, réversible et semblerait jouer des rôles spécifiques à chaque site de phosphorylation (Toivola, Ku et al. 2004). D'autres rôles que la réorganisation du réseau de kératines par ces phosphorylations ont été suggérés. Les phosphorylations des kératines pourraient déterminer la localisation de celles-ci dans un compartiment subcellulaire

spécifique, réguler leur association avec d'autres protéines ou encore avoir un rôle protecteur en cas de stress.

Une implication de JNK et de p38^{MAPK} dans la phosphorylation de K8PS73 avait déjà été signalée (Ku, Azhar et al. 2002). Dernièrement, une étude a montré que l'isoforme delta de PKC serait responsable de la phosphorylation de la kératine 8 sur S73 jusqu'à 24 heures après un stress de cisaillement dans des cellules épithéliales alvéolaires (Ridge, Linz et al. 2005). Comme autre exemple, Zhou a montré une phosphorylation de la kératine 20 sur sa sérine 13 après activation de PKC, menant à une réorganisation des filaments d'actine (Zhou, Cadrin et al. 2006).

Nous pourrions envisager de tester dans un premier temps si les voies PKC delta ou la P13kinase sont impliquées dans la réaction des kératinocytes dans notre modèle d'expositions répétées aux UV-B.

Inhiber la phosphorylation de p38^{MAPK} ou diminuer la quantité de p38^{MAPK} activable pourrait avoir des conséquences sur la phosphorylation de la kératine 8, pour l'augmentation de l'abondance de CapG, de la kératine 8 et 6. Nous pourrions par ailleurs repérer le lien entre la phosphorylation de p38^{MAPK} et celle de Hsp27, connue dans la littérature (Wong, Shi et al. 2000) (Guay, Lambert et al. 1997).

En conclusion, ce travail permet d'entrevoir un modèle possible d'intervention des protéines étudiées dans la réponse à plus ou moins long terme des kératinocytes à des expositions répétées aux UV-B. Les expositions aux UV-B constituent un des stress les plus intenses auxquels sont confrontés les kératinocytes, particulièrement dans le monde occidental où les expositions répétées au soleil représentent souvent un facteur de plaisir et de reconnaissance sociale.

De Corte, V., K. Van Impe, et al. (2004). "Increased importin-beta-dependent nuclear import of the actin modulating protein CapG promotes cell invasion." *J Cell Sci* **117**(Pt 22): 5283-92.

Eckert, R. L., J. F. Crish, et al. (1997). "The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation." *Physiol Rev* **77**(2): 397-424.

Guay, J., H. Lambert, et al. (1997). "Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27." *J Cell Sci* **110** (Pt 3): 357-68.

Iordanov, M. S., R. J. Choi, et al. (2002). "The UV (Ribotoxic) stress response of human keratinocytes involves the unexpected uncoupling of the Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling cascade from the activated epidermal growth factor receptor." *Mol Cell Biol* **22**(15): 5380-94.

- Ku, N. O., S. Azhar, et al. (2002). "Keratin 8 phosphorylation by p38 kinase regulates cellular keratin filament reorganization: modulation by a keratin 1-like disease causing mutation." *J Biol Chem* **277**(13): 10775-82.
- Kwiatkowski, D. J. (1999). "Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer." *Curr Opin Cell Biol* **11**(1): 103-8.
- Nozaki, J., M. Takehana, et al. (1997). "UVB irradiation induces changes in cellular localization and phosphorylation of mouse HSP27." *Photochem Photobiol* **65**(5): 843-8.
- Pellieux, C., A. Desgeorges, et al. (2003). "Cap G, a gelsolin family protein modulating protective effects of unidirectional shear stress." *J Biol Chem* **278**(31): 29136-44.
- Peus, D., R. A. Vasa, et al. (1999). "UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes." *J Invest Dermatol* **112**(5): 751-6.
- Ridge, K. M., L. Linz, et al. (2005). "Keratin 8 phosphorylation by protein kinase C delta regulates shear stress-mediated disassembly of keratin intermediate filaments in alveolar epithelial cells." *J Biol Chem* **280**(34): 30400-5.
- Rivero, F., B. Koppel, et al. (1996). "The role of the cortical cytoskeleton: F-actin crosslinking proteins protect against osmotic stress, ensure cell size, cell shape and motility, and contribute to phagocytosis and development." *J Cell Sci* **109** (Pt 11): 2679-91.
- Silacci, P., L. Mazzolai, et al. (2004). "Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions." *Cell Mol Life Sci* **61**(19-20): 2614-23.
- Sun, H. Q., K. Kwiatkowska, et al. (1995). "Effects of CapG overexpression on agonist-induced motility and second messenger generation." *J Cell Biol* **129**(1): 147-56.
- Toivola, D. M., N. O. Ku, et al. (2004). "Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease." *Hepatology* **40**(2): 459-66.
- Wang, H. Q., T. Quan, et al. (2003). "Epidermal growth factor receptor-dependent, NF-kappaB-independent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway inhibits ultraviolet irradiation-induced caspases-3, -8, and -9 in human keratinocytes." *J Biol Chem* **278**(46): 45737-45.
- Wang, Q., A. Turlington, et al. (2005). "Extracellular matrix activity and caveolae events contribute to cell surface receptor activation that leads to MAP kinase activation in response to UV irradiation in cultured human keratinocytes." *Int J Mol Med* **15**(4): 633-40.
- Way, K. J., E. Chou, et al. (2000). "Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches." *Trends Pharmacol Sci* **21**(5): 181-7.
- Witke, W., W. Li, et al. (2001). "Comparisons of CapG and gelsolin-null macrophages: demonstration of a unique role for CapG in receptor-mediated ruffling, phagocytosis, and vesicle rocketing." *J Cell Biol* **154**(4): 775-84.
- Wong, J. W., B. Shi, et al. (2000). "Ultraviolet B-mediated phosphorylation of the small heat shock protein HSP27 in human keratinocytes." *J Invest Dermatol* **115**(3): 427-34.
- Zhou, Q., M. Cadrin, et al. (2006). "Keratin 20 serine 13 phosphorylation is a stress and intestinal goblet cell marker." *J Biol Chem* **281**(24): 16453-61.

- Abdel-Naser, M. B., K. Krasagakis, et al. (2003). "Direct effects on proliferation, antigen expression and melanin synthesis of cultured normal human melanocytes in response to UVB and UVA light." Photodermatol Photoimmunol Photomed **19**(3): 122-7.
- Arrigo, A. P. (2001). "Hsp27: novel regulator of intracellular redox state." IUBMB Life **52**(6): 303-7.
- Bachelor, M. A. and G. T. Bowden (2004). "UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression." Semin Cancer Biol **14**(2): 131-8.
- Bickenbach, J. R. and K. L. Grinnell (2004). "Epidermal stem cells: interactions in developmental environments." Differentiation **72**(8): 371-80.
- Buss, J. E., C. Chouvet, et al. (1984). "Comparison of protein phosphorylations in variant A431 cells with different growth responses to epidermal growth factor." J Cell Physiol **119**(3): 296-306.
- Cadet, J., E. Sage, et al. (2005). "Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA." Mutat Res **571**(1-2): 3-17.
- Chainiaux, F., J. P. Magalhaes, et al. (2002). "UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts." Int J Biochem Cell Biol **34**(11): 1331-9.
- Coulombe, P. A. (1993). "The cellular and molecular biology of keratins: beginning a new era." Curr Opin Cell Biol **5**(1): 17-29.
- Coulombe, P. A. and M. B. Omary (2002). "'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments." Curr Opin Cell Biol **14**(1): 110-22.
- Cunningham, C. C., T. P. Stossel, et al. (1991). "Enhanced motility in NIH 3T3 fibroblasts that overexpress gelsolin." Science **251**(4998): 1233-6.
- De Corte, V., K. Van Impe, et al. (2004). "Increased importin-beta-dependent nuclear import of the actin modulating protein CapG promotes cell invasion." J Cell Sci **117**(Pt 22): 5283-92.
- De Fabo, E. C. (2005). "Arctic stratospheric ozone depletion and increased UVB radiation: potential impacts to human health." Int J Circumpolar Health **64**(5): 509-22.
- Dickson, M. A., W. C. Hahn, et al. (2000). "Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics." Mol Cell Biol **20**(4): 1436-47.
- Dimri, G. P., X. Lee, et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9363-7.
- Eckert, R. L., J. F. Crish, et al. (2004). "Regulation of involucrin gene expression." J Invest Dermatol **123**(1): 13-22.
- Freedberg, I. M., M. Tomic-Canic, et al. (2001). "Keratins and the keratinocyte activation cycle." J Invest Dermatol **116**(5): 633-40.
- Frippiat, C., J. Dewelle, et al. (2002). "Signal transduction in H₂O₂-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts." Free Radic Biol Med **33**(10): 1334-46.
- Fuchs, E. (1994). "Epidermal differentiation and keratin gene expression." Princess Takamatsu Symp **24**: 290-302.
- Gandarillas, A. (2000). "Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways?" Exp Gerontol **35**(1): 53-62.

- Gilbert, S., A. Loranger, et al. (2001). "Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation." *J Cell Biol* **154**(4): 763-73.
- Guay, J., H. Lambert, et al. (1997). "Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27." *J Cell Sci* **110** (Pt 3): 357-68.
- Haase, I., R. Evans, et al. (2003). "Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways." *J Cell Sci* **116**(Pt 15): 3227-38.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." *Exp Cell Res* **25**: 585-621.
- Ichihashi, M., M. Ueda, et al. (2003). "UV-induced skin damage." *Toxicology* **189**(1-2): 21-39.
- Iordanov, M. S., R. J. Choi, et al. (2002). "The UV (Ribotoxic) stress response of human keratinocytes involves the unexpected uncoupling of the Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling cascade from the activated epidermal growth factor receptor." *Mol Cell Biol* **22**(15): 5380-94.
- Jenkins, G. (2002). "Molecular mechanisms of skin ageing." *Mech Ageing Dev* **123**(7): 801-10.
- Kampinga, H. H. (2006). "Chaperones in preventing protein denaturation in living cells and protecting against cellular stress." *Handb Exp Pharmacol*(172): 1-42.
- Knebel, A., H. J. Rahmsdorf, et al. (1996). "Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents." *Embo J* **15**(19): 5314-25.
- Krtolica, A., S. Parrinello, et al. (2001). "Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(21): 12072-7.
- Ku, N. O., S. Azhar, et al. (2002). "Keratin 8 phosphorylation by p38 kinase regulates cellular keratin filament reorganization: modulation by a keratin 1-like disease causing mutation." *J Biol Chem* **277**(13): 10775-82.
- Ku, N. O. and M. B. Omary (1997). "Phosphorylation of human keratin 8 in vivo at conserved head domain serine 23 and at epidermal growth factor-stimulated tail domain serine 431." *J Biol Chem* **272**(11): 7556-64.
- Kwiatkowski, D. J. (1999). "Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer." *Curr Opin Cell Biol* **11**(1): 103-8.
- Lambrechts, A., M. Van Troys, et al. (2004). "The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility." *Int J Biochem Cell Biol* **36**(10): 1890-909.
- Lavoie, J. N., H. Lambert, et al. (1995). "Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27." *Mol Cell Biol* **15**(1): 505-16.
- Lehmann, B., K. Querings, et al. (2004). "Vitamin D and skin: new aspects for dermatology." *Exp Dermatol* **13** Suppl 4: 11-5.
- Lemmon, M. A., J. E. Ladbury, et al. (1994). "Independent binding of peptide ligands to the SH2 and SH3 domains of Grb2." *J Biol Chem* **269**(50): 31653-8.
- Li, D., T. G. Turi, et al. (2001). "Rays and arrays: the transcriptional program in the response of human epidermal keratinocytes to UVB illumination." *Faseb J* **15**(13): 2533-5.
- Liao, J., N. O. Ku, et al. (1997). "Stress, apoptosis, and mitosis induce phosphorylation of human keratin 8 at Ser-73 in tissues and cultured cells." *J Biol Chem* **272**(28): 17565-73.

- Maglio, D. H., M. L. Paz, et al. (2005). "Skin damage and mitochondrial dysfunction after acute ultraviolet B irradiation: relationship with nitric oxide production." Photodermatol Photoimmunol Photomed **21**(6): 311-7.
- Mazzalupo, S., P. Wong, et al. (2003). "Role for keratins 6 and 17 during wound closure in embryonic mouse skin." Dev Dyn **226**(2): 356-65.
- Michishita, M., K. Hirayoshi, et al. (1991). "Effects of type-beta 1 transforming growth factor on the proliferation and differentiation of mouse myelomonocytic leukemia cells (M1)." Exp Cell Res **196**(1): 107-13.
- Nemes, Z. and P. M. Steinert (1999). "Bricks and mortar of the epidermal barrier." Exp Mol Med **31**(1): 5-19.
- Nishio, K. and A. Inoue (2005). "Senescence-associated alterations of cytoskeleton: extraordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescent human fibroblasts." Histochem Cell Biol **123**(3): 263-73.
- Nozaki, J., M. Takehana, et al. (1997). "UVB irradiation induces changes in cellular localization and phosphorylation of mouse HSP27." Photochem Photobiol **65**(5): 843-8.
- Onoue, S., T. Kobayashi, et al. (2003). "Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation." J Dermatol Sci **33**(2): 105-11.
- Pellieux, C., A. Desgeorges, et al. (2003). "Cap G, a gelsolin family protein modulating protective effects of unidirectional shear stress." J Biol Chem **278**(31): 29136-44.
- Peus, D., R. A. Vasa, et al. (1999). "UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes." J Invest Dermatol **112**(5): 751-6.
- Peus, D., R. A. Vasa, et al. (1998). "H₂O₂ is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes." J Invest Dermatol **110**(6): 966-71.
- Plowman, G. D., G. S. Whitney, et al. (1990). "Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(13): 4905-9.
- Poumay, Y. and M. R. Pittelkow (1995). "Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins." J Invest Dermatol **104**(2): 271-6.
- Rheinwald, J. G. and H. Green (1975). "Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells." Cell **6**(3): 331-43.
- Rheinwald, J. G., W. C. Hahn, et al. (2002). "A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status." Mol Cell Biol **22**(14): 5157-72.
- Ridge, K. M., L. Linz, et al. (2005). "Keratin 8 phosphorylation by protein kinase C delta regulates shear stress-mediated disassembly of keratin intermediate filaments in alveolar epithelial cells." J Biol Chem **280**(34): 30400-5.
- Rittie, L. and G. J. Fisher (2002). "UV-light-induced signal cascades and skin aging." Ageing Res Rev **1**(4): 705-20.
- Rivero, F., B. Koppel, et al. (1996). "The role of the cortical cytoskeleton: F-actin crosslinking proteins protect against osmotic stress, ensure cell size, cell shape and motility, and contribute to phagocytosis and development." J Cell Sci **109** (Pt 11): 2679-91.
- Rouse, J., P. Cohen, et al. (1994). "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins." Cell **78**(6): 1027-37.

- Saladi, R. N. and A. N. Persaud (2005). "The causes of skin cancer: a comprehensive review." Drugs Today (Barc) **41**(1): 37-53.
- Sano, T., T. Kume, et al. (2005). "The formation of wrinkles caused by transition of keratin intermediate filaments after repetitive UVB exposure." Arch Dermatol Res **296**(8): 359-65.
- Schaeffer, H. J. and M. J. Weber (1999). "Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers." Mol Cell Biol **19**(4): 2435-44.
- Silacci, P., L. Mazzolai, et al. (2004). "Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions." Cell Mol Life Sci **61**(19-20): 2614-23.
- Sohal, R. S. (2002). "Oxidative stress hypothesis of aging." Free Radic Biol Med **33**(5): 573-4.
- Sun, H. Q., K. Kwiatkowska, et al. (1995). "Effects of CapG overexpression on agonist-induced motility and second messenger generation." J Cell Biol **129**(1): 147-56.
- Sun, H. Q., M. Yamamoto, et al. (1999). "Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein." J Biol Chem **274**(47): 33179-82.
- Toivola, D. M., H. Baribault, et al. (2000). "Simple epithelial keratins are dispensable for cytoprotection in two pancreatitis models." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **279**(6): G1343-54.
- Toivola, D. M., N. O. Ku, et al. (2004). "Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease." Hepatology **40**(2): 459-66.
- Toivola, D. M., Q. Zhou, et al. (2002). "Type II keratins are phosphorylated on a unique motif during stress and mitosis in tissues and cultured cells." Mol Biol Cell **13**(6): 1857-70.
- Toussaint, O., J. Remacle, et al. (2002). "Stress-induced premature senescence: from biomarkers to likelihood of in vivo occurrence." Biogerontology **3**(1-2): 13-7.
- Tyrrell, R. M. (1995). "Ultraviolet radiation and free radical damage to skin." Biochem Soc Symp **61**: 47-53.
- Wang, H. Q., T. Quan, et al. (2003). "Epidermal growth factor receptor-dependent, NF-kappaB-independent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway inhibits ultraviolet irradiation-induced caspases-3, -8, and -9 in human keratinocytes." J Biol Chem **278**(46): 45737-45.
- Wang, Q., A. Turlington, et al. (2005). "Extracellular matrix activity and caveolae events contribute to cell surface receptor activation that leads to MAP kinase activation in response to UV irradiation in cultured human keratinocytes." Int J Mol Med **15**(4): 633-40.
- Watt, F. M. (1998). "Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **353**(1370): 831-7.
- Way, K. J., E. Chou, et al. (2000). "Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches." Trends Pharmacol Sci **21**(5): 181-7.
- Witke, W., W. Li, et al. (2001). "Comparisons of CapG and gelsolin-null macrophages: demonstration of a unique role for CapG in receptor-mediated ruffling, phagocytosis, and vesicle rocketing." J Cell Biol **154**(4): 775-84.
- Wong, J. W., B. Shi, et al. (2000). "Ultraviolet B-mediated phosphorylation of the small heat shock protein HSP27 in human keratinocytes." J Invest Dermatol **115**(3): 427-34.
- Wong, P. and P. A. Coulombe (2003). "Loss of keratin 6 (K6) proteins reveals a function for intermediate filaments during wound repair." J Cell Biol **163**(2): 327-37.
- Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-37.
- Zaczek, A., B. Brandt, et al. (2005). "The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches." Histol Histopathol **20**(3): 1005-15.

Zhou, Q., M. Cadrin, et al. (2006). "Keratin 20 serine 13 phosphorylation is a stress and intestinal goblet cell marker." J Biol Chem **281**(24): 16453-61.